



Exploration de la reconnaissance de la courbure membranaire par le motif ALPS

Lydie Vamparys

► To cite this version:

Lydie Vamparys. Exploration de la reconnaissance de la courbure membranaire par le motif ALPS. Modélisation et simulation. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2013. Français. NNT: . tel-00934412

HAL Id: tel-00934412

<https://theses.hal.science/tel-00934412>

Submitted on 22 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT (PARIS 7)
École doctorale Interdisciplinaire pour le Vivant

Exploration de la reconnaissance de la courbure membranaire par le motif ALPS

Présentée par

Lydie Vamparys

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université Paris Diderot (Paris 7)

Spécialité : Modélisation moléculaire

Thèse soutenue le 13 novembre 2013 devant le jury composé de :

Pr. Nathalie Reuter	Université de Bergen, Norvège	Rapporteur
Pr. James Sturgis	Université Aix-Marseille 2	Rapporteur
Dr. Lucie Khemtémourian	CNRS	Examineur
Dr. Guillaume Drin	CNRS	Examineur
Dr. Fabien Ferrage	CNRS	Examineur
Dr. Marc Baaden	CNRS	Invité
Dr. Patrick Fuchs	Université Paris Diderot	Directeur de thèse
Pr. Catherine Etchebest	Université Paris Diderot	Co-directrice de thèse et présidente du jury

Remerciements

Je remercie chaleureusement Patrick Fuchs et Cathy Etchebest pour m'avoir encadrée pendant ces trois années. J'ai passé de très belles années à vos côtés qui ont été pour moi très enrichissantes à la fois professionnellement et humainement.

Patrick, j'ai appris énormément auprès de toi et tu as toujours été disponible pour moi. Tu es le chef que tout le monde rêverait d'avoir.

Je remercie Cathy Jackson de m'avoir accueillie avec autant de gentillesse dans son équipe. Merci à mes collègues de l'équipe de Cathy Jackson (Amélie, Alenka, Aymen, Lucie, Marie-Pierre, Samuel et Suzie) pour leur bonne humeur communicative et leur solidarité.

Mes pensées vont aussi vers mes collègues de l'équipe de Cathy Etchebest (Alexandre, Christel, Delphine, Gaëlle, Hubert, Jean-Christophe, Jeremy, Jonathan, Joseph, Lory, Luca, Pierre, Pierrick. . .) avec qui j'ai passé de superbes années. Une pensée particulière pour Yves et Marie-Catherine.

Je remercie Bruno Antonny de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour réaliser les expériences. Merci à tous les membres de son équipe (Bruno, Guillaume, Hélène, Joëlle, Maud, Romain et Stefano) pour leur dynamisme et leur bonne humeur. Guillaume, je te remercie tout particulièrement pour ta patience et ta disponibilité.

Je remercie ma famille et mes amis pour m'avoir encouragée et soutenue pendant ces trois années. Benoist, merci d'avoir été patient et compréhensif. Tu m'as été d'une aide très précieuse et j'espère que je pourrai un jour en faire autant pour toi.

Enfin, je souhaite dédier ce manuscrit à Christian Lair qui a été mon prof de mathématiques quand j'ai repris mes études et qui est devenu l'ami qui compte le plus pour moi. Christian, c'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Je vous remercie du fond du coeur.

Abréviations

ALPS	<i>Amphipathic Lipid Packing Sensor</i>
AMP	<i>Antimicrobial Peptide</i>
Arf1	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
ArfGAP1	<i>Arf GTPase-Activating Protein 1</i>
ASA	<i>Accessibility Surface Area</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
CD	<i>Circular Dichroism</i> , dichroïsme circulaire
COPI	<i>Coat Protein I</i>
COPII	<i>Coat Protein II</i>
CPP	<i>Cell Penetrating Peptide</i>
C-ter	C-terminale
DAG	diacylglycerol
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DM	Dynamique Moléculaire
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DMSO	dimethylsulfoxide
DOG	1,2-dioleoyl-sn-glycerol
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DSSP	<i>Define Secondary Structures of Proteins</i>
GDP	Guanosine Diphosphate
GTP	Guanosine Triphosphate
GRAB	<i>GRIP-related Arf-binding domain</i>
LINCS	<i>Linear Constraint Solver</i>
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i>
MCS	<i>Membrane Contact Sites</i>
ME	Microscopie Électronique
MLV	<i>Multilamellar Vesicles</i>
MRE	<i>Mean Residue molar Ellipticity</i>
MSD	<i>Mean Squared Displacement</i>
N-ter	N-terminale
NPT	Nombre d'atomes, pression et température constants

PB *Protein Blocks*, blocs protéiques
PBC conditions périodiques aux limites
PC phosphatidylcholine
PDB *Protein Data Bank*
PIP phosphoinositide
PME *Particle Mesh Ewald*
PMF *Potential of Mean Force*
POPC 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PR Parrinello-Rahman
RE Réticulum Endoplasmique
REMD *Replica Exchange Molecular Dynamics*, Dynamique Moléculaire avec échanges de répliques
RER Reticulum Endoplasmique Rugueux
RMN Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD *Root Mean Square Deviation*, écart quadratique moyen
SDS Sodium Dodecyl Sulfate
SUV *Small Unilamellar Vesicles*
US *Umbrella Sampling*
WHAM *Weighted Histogram Analysis Method*

Table des matières

1	Introduction Générale	17
2	Contexte biologique	21
2.1	Le transport vésiculaire	22
2.1.1	Bref historique	22
2.1.2	Le transport vésiculaire tel qu'on le voit aujourd'hui	22
2.2	Les membranes cellulaires	27
2.2.1	Bref historique	27
2.2.2	Les protéines intégrales	28
2.2.3	Les lipides membranaires	29
2.3	Interactions protéines périphériques-membranes	33
2.3.1	Insertion d'une hélice amphipathique	35
2.4	Physico-chimie des hélices amphipathiques	36
2.4.1	Les hélices amphipathiques	36
2.4.2	Paramètres physico-chimiques pour décrire les hélices amphipathiques	38
2.4.3	Partitionnement d'une hélice amphipathique dans la membrane .	40
2.4.4	Énergie libre de partitionnement d'une hélice amphipathique dans la membrane	40
2.5	Le motif ALPS	42
2.5.1	Le motif ALPS dans la protéine ArfGAP1	42
2.5.2	Le motif ALPS dans les autres protéines	44
3	Matériels et méthodes	47
3.1	Principe des simulations de dynamique moléculaire	47
3.1.1	Champ de forces empirique	49
3.1.2	L'algorithme de DM	50
3.1.3	Les conditions périodiques	51
3.1.4	Le contrôle de la température et de la pression	51
3.2	Le REMD	55
3.3	Paramètres et protocoles des simulations de DM utilisés dans ce travail .	55
3.3.1	Les lipides utilisés	55
3.3.2	Les peptides utilisés	57
3.3.3	Paramètres des simulations	58
3.4	Méthodes d'analyse des trajectoires utilisées dans ce travail.	58
3.4.1	Méthodes d'analyse des propriétés des membranes.	58
3.4.2	Méthode d'analyse des propriétés du peptide	67

3.5	Expériences <i>in vitro</i>	69
3.5.1	Préparation des liposomes	69
3.5.2	Détermination de la taille des liposomes	71
3.5.3	Détermination de la structure secondaire du peptide	71
3.5.4	Estimation du taux d'hélicité du peptide	73
3.5.5	Détermination de l'énergie libre de transfert de l'eau vers la membrane	74
4	Étude d'une bicouche plate enrichie en DOG	77
4.1	Est-ce-que le DOG crée directement des cavités à l'interface de la membrane ?	78
4.1.1	Partitionnement des lipides dans la bicouche	79
4.1.2	Hydratation des têtes polaires des lipides	80
4.1.3	Paramètre d'ordre des lipides	81
4.2	Comment le DOG modifie les propriétés dynamiques et élastiques de la membrane ?	82
4.2.1	Propriétés dynamiques	82
4.2.2	Propriétés élastiques	84
4.3	Caractérisation et quantification des défauts de packing entre les têtes polaires des lipides	86
4.3.1	Les méthodes utilisées pour caractériser les défauts de packing	87
4.3.2	Est-ce-que l'ajout du DOG augmente la probabilité d'occurrence des défauts de packing dans l'interface hydrophile/hydrophobe ?	88
4.3.3	Est-ce-que les défauts de packing se co-localisent avec le DOG ?	90
4.3.4	Est-ce-que les défauts induits par le DOG ou par la courbure positive sont similaires ?	91
4.4	Conclusion	91
5	Insertion du motif ALPS dans l'interface de la membrane	93
5.1	Le peptide ALPS se lie aux bicouches DOPC/DOG via l'insertion de gros résidus hydrophobes	94
5.1.1	Simulations à 300 K	95
5.1.2	Simulations à 333 K	96
5.2	Les gros résidus hydrophobes s'insèrent dans des défauts pré-existants	97
5.3	L'insertion du peptide ALPS induit des modifications mineures sur les défauts libres	100
5.4	Le motif ALPS préfère les bicouches avec une plus grande densité de défauts	101
5.5	Conclusion	102
6	Repliement du motif ALPS dans l'interface de la membrane	103
6.1	Repliement du peptide ALPS-35	104
6.1.1	Expérimentalement le peptide ALPS-35 se replie en hélice sur de grands liposomes enrichis en DOG	104
6.1.2	Le peptide ALPS-35 ne se replie pas en hélice à 333 K par simulation de DM (à l'échelle de la μs)	105
6.1.3	Le peptide ALPS-35 n'est pas thermostable	106
6.2	Repliement du peptide ALPS-23	108

6.2.1	Expérimentalement le peptide ALPS-23 se replie en hélice à la surface de grands liposomes enrichis en DOG	108
6.2.2	Le peptide ALPS-23 ne se replie pas en hélice avec le REMD . . .	109
6.3	Conclusion	114
7	Énergie libre de partitionnement du motif ALPS dans la membrane	117
7.1	Énergie libre de partitionnement en hélice du motif ALPS dans la membrane	119
7.1.1	Le peptide ALPS-35	119
7.1.2	Le peptide ALPS-23	120
7.2	Énergie libre de partitionnement en conformation non structurée du motif ALPS dans la membrane	121
7.3	Énergie libre de repliement du motif ALPS dans l'interface	123
7.4	Y a-t-il coopérativité entre les défauts de packing et le repliement de l'hélice ?	124
7.5	Conclusion	125
8	Conclusion et Perspectives	127
8.1	Conclusion	127
8.2	Perspectives	128
	Références	131
	Appendice	141

Liste des figures

2.1	Illustration du transport intracellulaire.	23
2.2	Cliché de microscopie électronique montrant les vésicules de transport au sein de l'appareil de Golgi.	23
2.3	Représentation du transport vésiculaire montrant la voie de sécrétion et l'endocytose.	23
2.4	Étapes du transport vésiculaire.	24
2.5	Cycle d'activation de Arf1.	25
2.6	Illustration de la formation d'une vésicule recouverte par le manteau protéique COPI.	26
2.7	La membrane des cellules selon Gorter et Grendel en 1925.	27
2.8	Schéma de la mosaïque de Singer et Nicolson.	27
2.9	Illustration de la composition d'une membrane plasmique.	28
2.10	Structures formées par les différentes formes de lipide.	29
2.11	Illustration d'une insaturation dans une chaîne aliphatique.	30
2.12	Représentation schématique des défauts de <i>packing</i>	30
2.13	Transition de phase dans une bicouche lipidique.	31
2.14	Représentation d'un glycérophospholipide.	32
2.15	Diversité des lipides au sein de la cellule.	34
2.16	Mécanismes utilisés par les protéines périphériques pour interagir avec les membranes.	35
2.17	Étapes pour la liaison d'une hélice amphipathique cationique à la surface d'une membrane anionique.	37
2.18	Représentation de la séquence d'une hélice en roue hélicoïdale.	38
2.19	Hydrophobie interfaciale des 20 acides aminés naturels dans une membrane de POPC.	39
2.20	Partitionnement d'une hélice amphipathique (Ac-18A-NH ₂) dans une bicouche de DOPC.	41
2.21	Cycle thermodynamique de la liaison d'un peptide interfacial dans la membrane.	41
2.22	Adsorption du motif ALPS à la surface d'une membrane courbée.	43
2.23	Identification du second motif ALPS dans la protéine ArfGAP1.	44
2.24	Représentation en roue hélicoïdale des motifs ALPS de GMAP-210, Kes1 et Nup133.	45
3.1	Résolutions spatiotemporelles de plusieurs techniques biophysiques.	48
3.2	Méthode d'intégration « Leap-Frog ».	51
3.3	Représentation des conditions périodiques.	52

3.4	Méthode du <i>cutoff</i>	54
3.5	Représentation schématique du REMD dans lequel les répliques du même système évoluent dans le temps et dans les températures.	55
3.6	Représentation en roue hélicoïdale des peptides ALPS-35 et ALPS-23. . .	57
3.7	Évaluation de l'aire par DOPC et de l'aire par DOG en faisant varier la concentration en DOG (x).	60
3.8	Évaluation du volume par DOPC et du volume par DOG en faisant varier la concentration en DOG (x).	60
3.9	Estimation de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche à partir de la densité des premiers carbones aliphatiques (atomes C2).	61
3.10	Illustration du calcul de $g(r)$	62
3.11	Fonction de la distribution radiale $g(r)$ pour un fluide de Lennard-Jones. . .	62
3.12	Estimation du paramètre d'ordre des lipides.	63
3.13	Représentation de $ \mathbf{U}(\mathbf{q}) ^2$ en fonction de q en échelle log-log pour trois tailles de systèmes : petit (losanges), moyen (cercles) et grand (carrés). .	66
3.14	Représentation schématique du profil de pression latérale dans une bicouche. .	67
3.15	Représentation d'un liposome multilamellaire (MLV), de petits liposomes unilamellaires (SUV) et de gros liposomes unilamellaires (LUV).	70
3.16	Image d'un extrudeur.	70
3.17	Phénomène de dichroïsme circulaire.	72
3.18	Spectre de dichroïsme circulaire de différentes structures secondaires. . .	73
4.1	Illustration des défauts de <i>packing</i> entre les lipides.	77
4.2	Structures formées par des mélanges diacylglycerol (DAG) dans une bicouche de phosphatidylcholine (PC).	78
4.3	Densité dans les bicouches DOPC/DOG et DOPC.	79
4.4	Distribution radiale $g(r)$ des atomes d'oxygène O4 des lipides vs les atomes d'oxygène de l'eau OW.	81
4.5	Paramètre d'ordre du DOPC et du DOG dans les bicouches DOPC et DOPC/DOG.	82
4.6	PMF pour transférer la tête polaire du DOPC et du DOG de l'interface polaire/apolaire vers le centre d'une bicouche de DOPC ou de DOPC/DOG. .	83
4.7	Cliché durant la translocation du DOG et du DOPC au centre de la bicouche. .	84
4.8	Profil de pression latérale dans les bicouches de DOPC et de DOPC/DOG. .	85
4.9	Détection des défauts de <i>packing</i>	87
4.10	Illustration de notre nouvelle méthode pour détecter les défauts de <i>packing</i> . .	88
4.11	Distribution de la taille des défauts de <i>packing</i> dans différentes bicouches. .	89
4.12	Constantes de décroissance dans des membranes plates et dans une membrane courbée positivement.	91
5.1	Cliché de l'état initial du système.	94
5.2	Séquence du peptide ALPS-35.	95
5.3	Insertion de ALPS-35 à 300 K.	96
5.4	Insertion de ALPS-35 à l'interface d'une bicouche DOPC/DOG à 333 K. .	97
5.5	Évolution de la coordonnée z du centre de masse de ALPS-35 (<i>backbone</i>) par rapport à la coordonnée z des phosphores à 333 K.	98
5.6	Évolution du rayon de giration de ALPS-35 à 333 K.	98

5.7	Suivi de l'insertion de la F26 avec la formation d'un défaut de <i>packing</i> . . .	99
5.8	Effet de l'insertion du peptide sur la distribution de la taille des défauts de <i>packing</i>	100
6.1	Structure secondaire du motif ALPS-35 en présence de liposomes.	104
6.2	Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-35 au cours des simulations à 333 K.	106
6.3	Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-35 à 333 K (en partant du peptide en hélice- α et inséré dans l'interface de la membrane).	107
6.4	Effet de la température sur la structure secondaire du peptide ALPS-35.	107
6.5	Structure secondaire du motif ALPS-23 en présence de liposomes.	109
6.6	Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-23 par REMD	110
6.7	Évolution de la coordonnée z du centre de masse de ALPS-23 (<i>backbone</i>) par rapport à la coordonnée z des phosphores au cours du temps dans la réplique à 300 K.	111
6.8	Évolution des énergies (peptide-peptide, peptide-lipides et peptide-eau) et du rayon de giration au cours du temps dans la réplique à 300 K.	112
6.9	<i>Clustering</i> des conformations du peptide ALPS-23 dans la réplique à 300 K après 125 ns de simulation.	112
6.10	Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-23 par REMD (peptide en hélice et inséré).	113
7.1	Principe général de liaison d'un peptide interfacial dans la membrane.	118
7.2	Couplage partitionnement-repliement du peptide ALPS-35 dans la membrane de DOPC.	119
7.3	Courbe d'ajustement pour l'estimation de l'énergie libre de partitionnement en hélice de ALPS-35 dans la membrane à partir du modèle de Fernandez-Vidal <i>et al.</i> (2011).	120
7.4	Couplage partitionnement-repliement du peptide ALPS-23 dans trois membranes de composition lipidique différente.	120
7.5	Énergie libre du partitionnement des peptides ALPS-35 et ALPS-23 selon l'échelle de Wimley et White (1996).	122
7.6	Énergies libres de partitionnement, en hélice et en conformation non structurée, des peptides ALPS-35 et ALPS-23 dans l'interface d'une membrane de DOPC.	123
7.7	Distribution de la taille des défauts de <i>packing</i> quand le peptide est inséré, en hélice et en conformation non structurée, dans l'interface d'une membrane de DOPC/DOG.	124

Liste des tableaux

2.1	Les différents types de transports selon leurs origines et leurs manteaux. .	25
2.2	Classes de glycérophospholipides.	32
2.3	Exemple de longueurs des chaînes aliphatiques avec ou non des insaturations.	33
3.1	Les champs de force communs pour les protéines, lipide et acides nucléiques.	50
3.2	Lipides utilisés dans ce travail.	56
3.3	Paramètres des simulations.	58
3.4	Aperçu des différentes simulations et types d'analyse.	59
4.1	Diffusion latérale des lipides dans les bicouches de DOPC et de DOPC/DOG.	83
4.2	Modules de compressibilité et de rigidité dans les bicouches de DOPC et DOPC/DOG.	86
4.3	Constantes de décroissance en nm^{-2} dans différentes bicouches.	89
4.4	Distribution spatiale de défauts de <i>packing</i> dans une bicouche DOPC/DOG.	90
5.1	Mécanisme d'insertion du motif ALPS-35 dans une bicouche DOPC/DOG.	95
5.2	Mécanisme d'insertion du motif ALPS-35 dans les bicouches DOPC/DOG et DMPC à 300 K.	101
6.1	Hélicité du peptide ALPS-35 estimée à partir des expériences de CD et des simulations de DM (avec DSSP).	108
6.2	Hélicité du peptide ALPS-23 estimée à partir de la réplique à 300 K (avec DSSP et les blocs protéiques).	114
7.1	Énergie libre de partitionnement en hélice du peptide ALPS-23 pour trois compositions lipidiques différentes.	121
1	Résumé des mesures expérimentales sur les bicouches.	143
2	Températures de transition de phase pour les glycérophospholipides. . . .	144

1

Introduction Générale

Le ciblage des membranes par les protéines ou les peptides est un mécanisme impliqué dans de nombreux processus biologiques fondamentaux comme le transport intracellulaire. Dans le transport intracellulaire, les protéines et les lipides transitent à travers la cellule pour atteindre leur destination finale par l'intermédiaire de vésicules de transport ou de sites de contacts membranaires, deux phénomènes finement contrôlés par l'adressage des protéines à la membrane.

Dans ce travail, nous nous intéressons au motif *Amphipathic Lipid Packing Sensor* (ALPS) de la protéine *Arf GTPase-Activating Protein 1* (ArfGAP1) qui cible la membrane de l'appareil de Golgi pour désassembler le manteau protéique recouvrant une vésicule naissante. C'est un motif général retrouvé dans d'autres protéines liant des membranes courbées.

Le motif ALPS a été découvert par Bruno Antonny et ses collaborateurs. Ce motif présente la particularité d'être sensible à la forme de la membrane mais également à la géométrie des lipides. Cette observation a mené à l'hypothèse que le motif ALPS ne reconnaît pas la courbure membranaire en elle-même mais plutôt les défauts de *packing* entre les lipides induits par la courbure. Il présente une composition en acide aminé assez singulière par rapport aux hélices amphipathiques classiques comme les peptides antimicrobiens. Il est riche en gros résidus hydrophobes sur sa face apolaire, riche en petits résidus polaires et pauvre en résidus chargés sur sa face polaire. L'hypersensibilité

du motif ALPS pour les membranes contenant des défauts de *packing* entre les lipides semble donc provenir de la longueur de son hélice amphipathique et du fort déséquilibre entre ses faces polaire et apolaire.

Cette propriété remarquable de reconnaissance de courbure / géométrie des lipides du motif ALPS pose de nombreuses questions sur les mécanismes fins d'un tel phénomène. De là est née une collaboration entre le laboratoire de biochimie de Bruno Antonny (Nice, Sophia Antipolis) et notre laboratoire spécialisé (entre autre) en modélisation moléculaire.

Dans ce contexte, le but de mon travail a été de comprendre comment le motif ALPS reconnaît les défauts de *packing* entre les lipides. Pour aborder cette question complexe, nous l'avons décomposée en questions plus simples :

- Qu'est ce qu'un défaut de *packing* ? Comment les caractériser et les quantifier ?
- Comment le motif ALPS s'insère dans l'interface d'une membrane contenant de tels défauts ?
- Comment le motif ALPS se replie en hélice dans l'interface d'une membrane contenant des défauts ?
- Quelle est l'affinité du motif ALPS pour différentes compositions lipidiques et courbures ? Comment cette affinité se décompose-t-elle ?

Pour répondre à ces questions, nous avons travaillé par Dynamique Moléculaire (DM) et *Circular Dichroism*, dichroïsme circulaire (CD) avec des membranes modèles et le motif ALPS de la protéine ArfGAP1, que nous appellerons ALPS-35.

Ce manuscrit s'organise de la manière suivante :

Dans le chapitre 2 « Contexte biologique » je décris tout d'abord le transport vésiculaire car c'est un mécanisme majeur dans la régulation des protéines et des lipides et surtout parce que c'est dans ce mécanisme que le premier motif ALPS a été découvert. Je décris ensuite les membranes cellulaires, les protéines périphériques puis le motif ALPS.

Dans le chapitre 3 « Matériels et Méthodes » je présente les techniques, protocoles et méthodes d'analyse qui ont été utilisés dans ce travail.

Dans le chapitre 4 « Étude d'une bicouche plate enrichie en DOG » je montre comment nous avons caractérisé et quantifié des défauts de *packing* à partir des simulations de DM. J'examine également les propriétés structurales, dynamiques et élastiques d'une bicouche composée de lipides cylindriques enrichie ou non en lipides coniques.

Dans le chapitre 5 « Insertion du motif ALPS dans l'interface de la membrane » j'analyse les premiers événements d'insertion du peptide ALPS-35 dans l'interface de la membrane par des simulations de DM tout-atome.

Dans le chapitre 6 « Repliement du motif ALPS dans l'interface de la membrane » j'étudie le mécanisme de repliement du motif ALPS dans l'interface d'une membrane par

des simulations de DM et des expériences de CD. Pour ce faire nous avons étudié en plus du peptide ALPS-35, le peptide ALPS-23 (correspondant au 23 premiers résidus de ALPS-35) pour pouvoir réaliser des simulations de *Replica Exchange Molecular Dynamics*, Dynamique Moléculaire avec échanges de répliques (REMD).

Dans le chapitre 7 « Énergie libre de partitionnement du motif ALPS dans la membrane » j'examine le partitionnement du motif ALPS du point de vue thermodynamique pour estimer l'affinité de liaison des peptides ALPS-35 et ALPS-23.

Les résultats de ce travail sont principalement issus de simulations de DM tout-atome. La partie expérimentale a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Bruno Antonny. Il est la continuation du précédent travail mené par Paula Gonzalez-Rubio.

2

Contexte biologique

Les cellules eucaryotes sont organisées en compartiments cellulaires (organites) isolés les uns des autres et du cytoplasme par une membrane (voir partie 2.1.2). Chacun de ces organites assure une fonction spécifique pour le maintien et la survie de la cellule. Par exemple, le noyau renferme les molécules d'ADN, le Réticulum Endoplasmique (RE) est le lieu de synthèse des protéines et des lipides, l'appareil de Golgi assure la glycosylation et le tri des protéines, les lysosomes assurent la digestion cellulaire et les mitochondries produisent l'énergie de la cellule. La compartimentation permet donc à la cellule de réaliser simultanément plusieurs réactions chimiques, compatibles ou non, et de stocker l'énergie cellulaire. Toutefois pour fonctionner comme une unité, la cellule a besoin de faire communiquer ses compartiments entre eux. À cet effet elle a mis en place un mécanisme appelé transport intracellulaire.

Les deux principaux types de transport intracellulaire sont le passage de lipides et d'ions par des sites de contacts membranaires (ou *Membrane Contact Sites* (MCS)) et le transport de protéines et de lipides par l'intermédiaire de vésicules (transport vésiculaire).

Les MCS correspondent à des sites de contacts entre deux compartiments cellulaires proches. De telles zones de proximité ont été visualisées par des expériences de Microscopie Électronique (ME) dans les années 50, quand l'association entre le RE et la mitochondrie a été décrite pour la première fois par Copeland et Dalton (1959). Depuis cette découverte, notre connaissance sur l'architecture des MCS provient en grande partie de la ME à haute

résolution qui suggère dans tous les cas documentés un organite s’approchant d’un autre mais sans fusionner avec ce dernier.

Quant au transport vésiculaire, c’est dans ce mécanisme que le motif ALPS (voir section 2.5), auquel nous nous intéressons tout particulièrement dans ce travail, a été identifié pour la première fois. Il convient donc de le décrire plus en détail.

2.1 LE TRANSPORT VÉSICULAIRE

2.1.1 BREF HISTORIQUE

Le transport intracellulaire (Figure 2.1) a été mis en évidence pour la première fois par Caro et Palade en 1964 grâce à des expériences *in vivo* (Caro et Palade, 1964) mais les détails et les besoins de ce mécanisme ne sont devenus évidents qu’après les travaux de Jamieson et Palade en 1967 (Jamieson et Palade, 1967). Grâce à des expériences *in vitro* sur des couches de tissus de pancréas, Jamieson et Palade ont suggéré que les protéines sécrétées dans le RE sont transportées vers l’appareil de Golgi via des vésicules. Ils montrent que les protéines sécrétées en provenance du Reticulum Endoplasmique Rugueux (RER) passent dans des éléments de transition puis par des petites vésicules périphériques du côté *cis* de l’appareil de Golgi et finalement, après 30 minutes, qu’elles sont retrouvées dans de grandes vacuoles (vacuoles condensées) côté *trans* du Golgi (Figure 2.1). Une autre importante découverte issue de leur travail est que le transport intracellulaire nécessite de l’énergie sous forme d’Adénosine Triphosphate (ATP) pour l’excrétion des protéines sécrétées du RER.

Quelques années plus tard, en 1986, Lelio Orci, Benjamin S. Glick et James E. Rothman mettent en évidence le transport vésiculaire (Figure 2.2) (Orci *et al.*, 1986). À partir de membranes golgiennes isolées incubées en présence d’ATP et d’une fraction de protéines cytosoliques, Orci *et al.* observent une population de vésicules de taille uniforme (~ 100 nm de diamètre) bourgeonnant à partir de plusieurs citernes du Golgi (Figure 2.2). En regardant de plus près ces vésicules, ils constatent qu’elles sont recouvertes d’un manteau protéique qui diffère de la clathrine connue depuis les années soixante (Roth et Porter, 1964). Ainsi, leur travail met en évidence à la fois le transport vésiculaire au sein du Golgi et un nouveau manteau protéique.

2.1.2 LE TRANSPORT VÉSICULAIRE TEL QU’ON LE VOIT AUJOURD’HUI

Dans le transport vésiculaire (Figure 2.3), on peut identifier deux grandes voies : la voie de sécrétion et l’endocytose. La voie de sécrétion correspond au transport des vésicules en provenance du RE vers la membrane plasmique ou les autres organites de

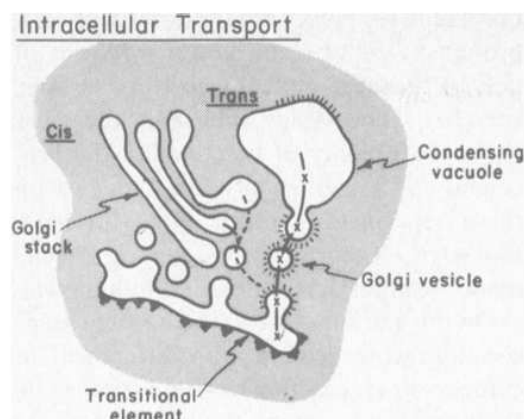


FIGURE 2.1 – Illustration du transport intracellulaire. Les traits pleins avec les croix représentent le chemin suivi dans les cellules exocrines de pancréas et les traits discontinus représentent le chemin suivi dans les autres cellules glandulaires. Tiré de Palade (1975).

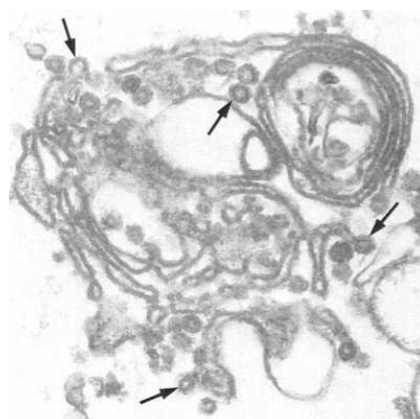


FIGURE 2.2 – Cliché de microscopie électronique montrant les vésicules de transport au sein de l'appareil de Golgi. Les vésicules de transport sont indiquées par les flèches. Tiré de Orci *et al.* (1986).

la cellule. Par opposition, l'endocytose correspond au transport inverse, c'est-à-dire en provenance de la membrane plasmique vers le RE.

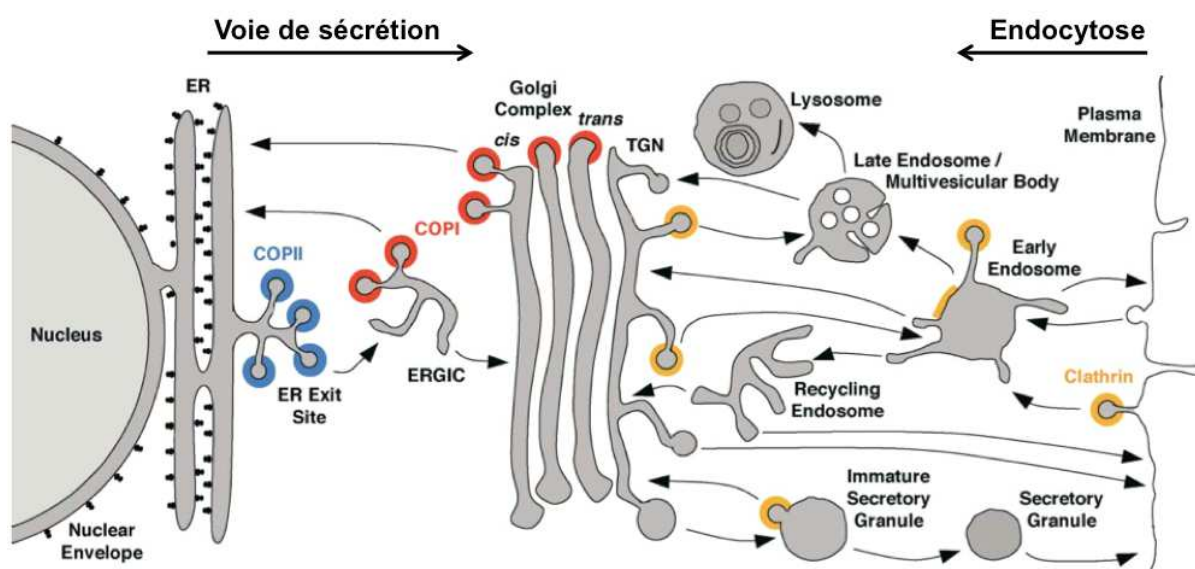


FIGURE 2.3 – Représentation du transport vésiculaire montrant la voie de sécrétion et l'endocytose. La voie de sécrétion correspond au transport du RE vers la membrane plasmique et les autres organites de la cellule. L'endocytose correspond au transport inverse, c'est-à-dire en provenance de la membrane plasmique. Tiré de Bonifacino et Glick (2004).

À la fois pour la voie de sécrétion et l'endocytose, le cargo (molécule à transporter) est introduit dans la vésicule par le bourgeonnement du compartiment donneur puis est libéré par la fusion de la vésicule avec le compartiment accepteur (Figure 2.4).

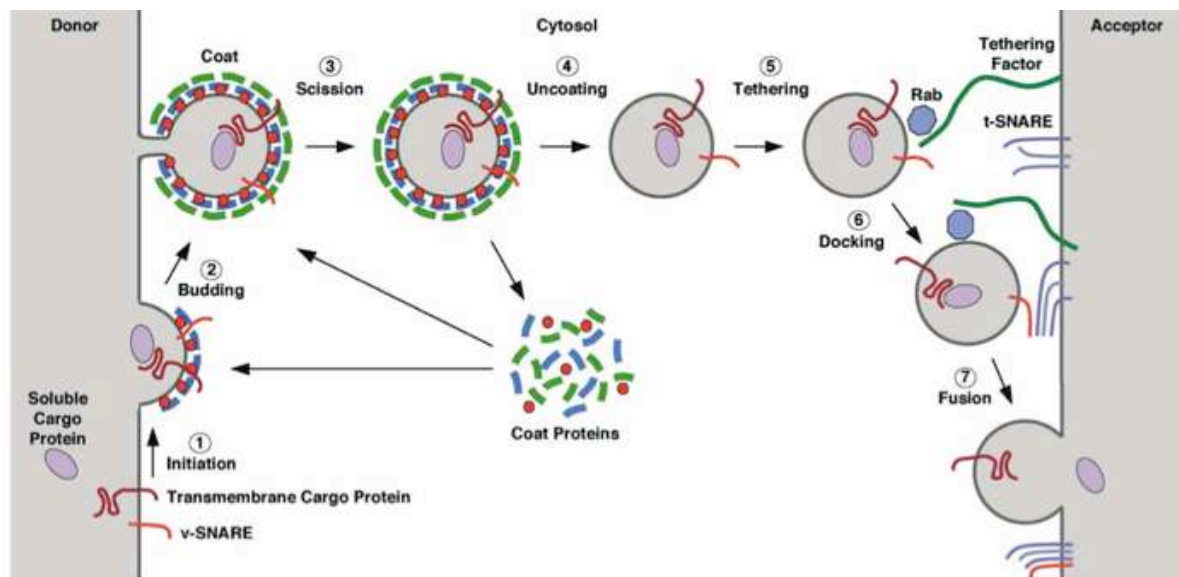


FIGURE 2.4 – Étapes du transport vésiculaire. (1) Assemblage du manteau protéique. (2) Formation d'une vésicule par le bourgeonnement du compartiment donneur. (3) Libération de la vésicule par pincement. (4) Détachement du manteau protéique. (5) Attachement de la vésicule au compartiment accepteur. (6) Amarrage de la vésicule. (7) Fusion de la vésicule avec le compartiment accepteur. Tiré de Bonifacino et Glick (2004).

BOURGEONNEMENT EN VÉSICULE DU COMPARTIMENT DONNEUR

Le bourgeonnement du compartiment donneur en vésicule et l'incorporation du cargo sont tous deux assurés par des manteaux protéiques (Bonifacino et Lippincott-Schwartz, 2003; Kirchhausen, 2000).

Un manteau protéique est un complexe formé de plusieurs protéines issues du cytoplasme qui viennent recouvrir la vésicule naissante. La polymérisation de ce manteau à la surface de la membrane apporte l'énergie nécessaire pour induire le bourgeonnement de la membrane et ainsi la formation d'une vésicule.

Ainsi, trois types de transport vésiculaire ont été caractérisés au niveau moléculaire par leur origine membranaire et leur manteau protéique (Kirchhausen, 2000) (Tableau 2.1 et Figure 2.3).

Le premier transport se déroule à la sortie de l'appareil de Golgi et dans certaines voies de l'endocytose (Schmid, 1997). Les vésicules de transport prennent leur source à partir de la membrane du réseau *trans*-golgien ou de la membrane plasmique et sont recouvertes du manteau clathrine.

Transport	Origine	Manteau
Post-Golgi incluant la membrane plasmique, le réseau <i>trans</i> -golgien (TGN) et les endosomes	Membrane plasmique/TGN	clathrine
Du RE vers le compartiment intermédiaire RE-Golgi et vers le Golgi	Membrane du RE	<i>Coat Protein II</i> (COPII)
Intra-Golgi et du Golgi vers le RE	Membrane du Golgi	COPI

Tableau 2.1 – Les différents types de transports selon leurs origines et leurs manteaux.

Le deuxième transport correspond à la voie sécrétoire qui permet aux protéines nouvellement synthétisées dans le RE d'être exportées vers le Golgi (Barlowe, 1998; Schekman et Orci, 1996). Les vésicules de transport prennent leur source à partir de la membrane du RE et sont recouvertes du manteau COPII.

Le dernier transport s'effectue au sein des saccules du Golgi (intra-Golgi) ou en provenance du Golgi vers le réticulum endoplasmique (Orci *et al.*, 1997). Dans ce cas, les vésicules de transport prennent leur source à partir de la membrane du Golgi et sont recouvertes du manteau COPI.

Pour illustrer la formation d'une vésicule, prenons comme exemple le transport où la vésicule est recouverte par le manteau protéique COPI (Figure 2.6). Tout d'abord, la protéine G *ADP-ribosylation factor 1* (Arf1) est activée par le facteur d'échange GBF1 et se lie sous sa forme active (Arf1-GTP) à la membrane (Figure 2.5 et Figure 2.6).

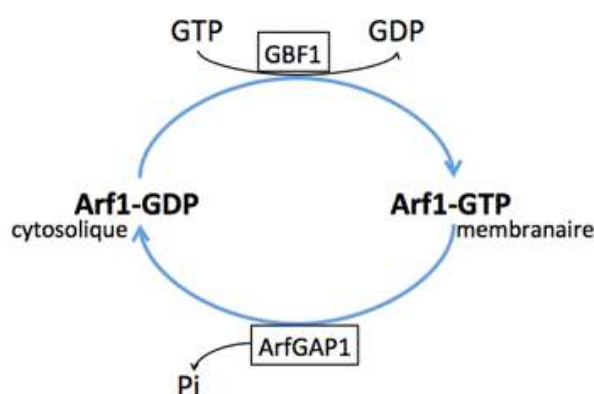


FIGURE 2.5 – Cycle d'activation de Arf1. Arf1 est activée par le facteur d'échange GBF1 et est désactivée par la protéine ArfGAP1.

Ensuite Arf1-GTP « recrute » le manteau protéique COPI à la surface de la membrane du Golgi (Rothman et Wieland, 1996). La polymérisation du manteau provoque le bourgeonnement de la membrane et lorsque la membrane est suffisamment courbée la protéine

ArfGAP1 (pour Arf GTPase-Activating Protein 1) vient se lier à son tour sur la membrane. La liaison de ArfGAP1 sur la vésicule naissante entraîne la désactivation de Arf1 (Arf-GTP devient Arf1-GDP) (Goldberg, 1999; Mandiyan *et al.*, 1999) et le désassemblage du manteau COPI (Bigay *et al.*, 2003; Cukierman *et al.*, 1995) qui libère la vésicule mature.

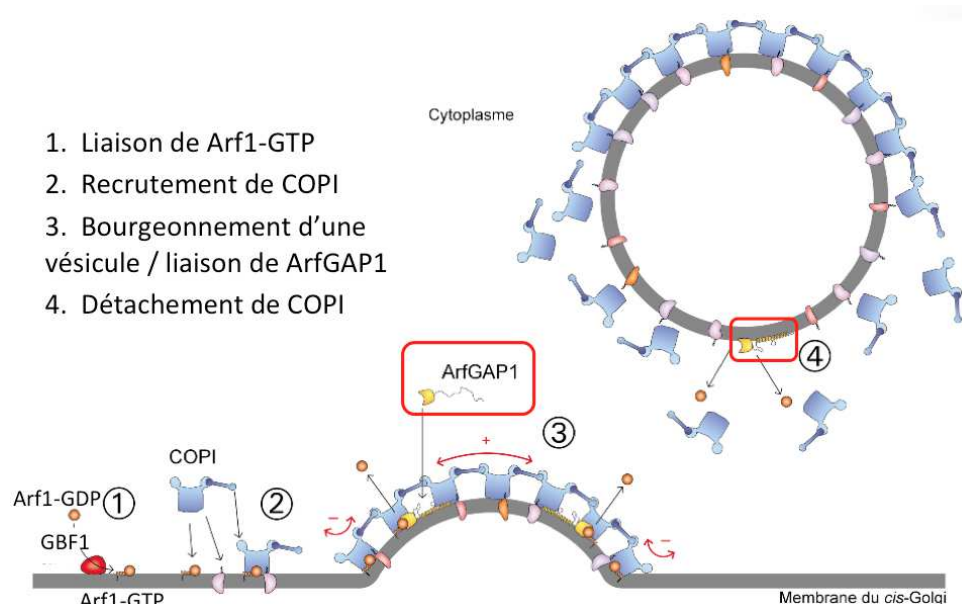


FIGURE 2.6 – Illustration de la formation d'une vésicule recouverte par le manteau protéique COPI.

FUSION DE LA VÉSICULE AVEC LE COMPARTIMENT ACCEPTEUR

La fusion membranaire est un processus crucial impliqué à la fois dans la fonction cellulaire et dans l'infection par un virus enveloppé. Dans le cas de la fonction cellulaire, la reconnaissance et la fusion de la vésicule avec le compartiment accepteur dépendent d'une machinerie incluant les protéines SNARE (Duman et Forte, 2003). Les protéines SNARE sont des protéines transmembranaires présentes à la fois sur la vésicule de transport (*v*-SNARE) et sur le compartiment accepteur (*t*-SNARE) (Rothman, 1994).

L'association de ces deux protéines entraîne le rapprochement de la vésicule de sa cible pour permettre sa fusion et ainsi la libération de la molécule transportée.

En résumé, le transport vésiculaire est donc un mécanisme important qui est finement contrôlé par plusieurs acteurs qui agissent à différents niveaux. Des dysfonctionnements dans ce mécanisme ont été identifiés comme étant à l'origine de nombreuses maladies héréditaires et auto-immunes (Aridor et Hannan, 2000, 2002). Par exemple, la perte de fonction de la protéine transportée ou l'accumulation de protéines anormales dans le RE

sont à l'origine de nombreuses maladies touchant différents organes tels que le coeur, le rein, le foie et les poumons. Une meilleure compréhension du transport vésiculaire présente donc un enjeu important pour améliorer l'efficacité des traitements actuels.

Abordons, maintenant, la description des membranes cellulaires, ces acteurs fondamentaux impliqués dans le mécanisme du transport vésiculaire.

2.2 LES MEMBRANES CELLULAIRES

Organisées en double feuillet autour de la cellule et des compartiments cellulaires, les membranes protègent le contenu de la cellule de l'environnement extérieur et le contenu des organites des constituants du cytoplasme. De plus, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les membranes subissent des déformations structurales pour permettre le transport des protéines et des lipides. Les membranes cellulaires sont donc indispensables au maintien et à l'équilibre de la cellule.

2.2.1 BREF HISTORIQUE

La première grande avancée dans notre connaissance des membranes date de 1925 par Gorter et Grendel sur la découverte de la structure en bicouche (Figure 2.7). À partir d'un extrait lipidique issu des globules rouges, les lipides ont été répartis sur une surface d'eau et compressés afin de produire une monocouche lipidique dense. Lorsque Gorter et Grendel ont mesuré l'aire de la monocouche obtenue, elle s'est trouvée être deux fois plus grande que celle de l'extrait lipidique initial dont l'aire était connue par microscopie. La seule explication possible fut que les membranes ont une épaisseur correspondant seulement à deux molécules comme illustré dans la Figure 2.7.

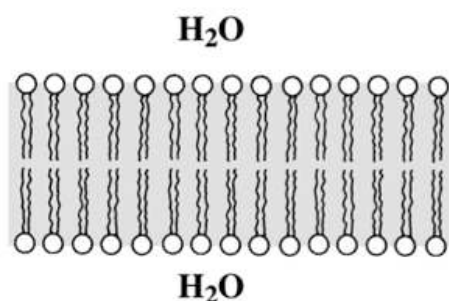


FIGURE 2.7 – La membrane des cellules selon Gorter et Grendel en 1925.

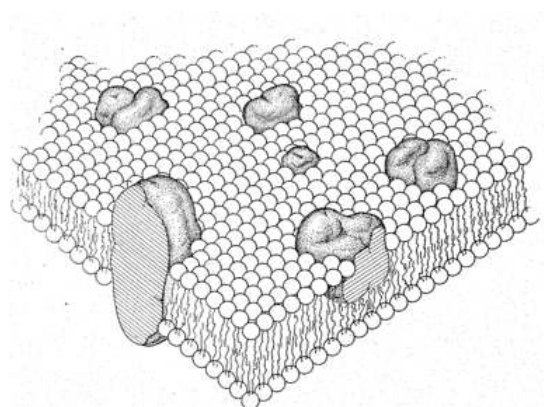


FIGURE 2.8 – Schéma de la mosaïque de Singer et Nicolson. Tiré de Singer et Nicolson (1972).

La deuxième importante avancée est le célèbre modèle fluide-mosaïque proposé par Singer et Nicolson en 1972 (Figure 2.8). Le modèle fluide-mosaïque a été le premier à représenter la membrane sous un état fluide. Le concept de fluidité a été conçu pour caractériser la bicouche lipidique comme un pseudo liquide à deux dimensions dans lequel à la fois les protéines associées à la membrane et les lipides sont suffisamment mobiles pour être pleinement fonctionnels. Le terme mosaïque vient de l'apparence générale de ce composé fluide de lipides et de protéines.

La représentation actuelle des membranes cellulaires (Figure 2.9) est en fait issue du modèle fluide-mosaïque proposé par Singer et Nicolson en 1972. Bien que ce modèle fût le premier à prendre en compte les aspects dynamiques des membranes biologiques, il a subi au fil des années plusieurs raffinements afin de reproduire plus fidèlement certaines propriétés spécifiques à certains compartiments cellulaires et à certaines cellules. Les principales modifications sont l'ajustement entre les lipides et les protéines, le repliement de la membrane, la formation de pores, les variations d'épaisseur, la distribution non-homogène des composants (modèle proposé par Israelachvili en 1978) et la présence d'un cytosquelette et du glycocalyx (modèle proposé par Sackmann en 1995).

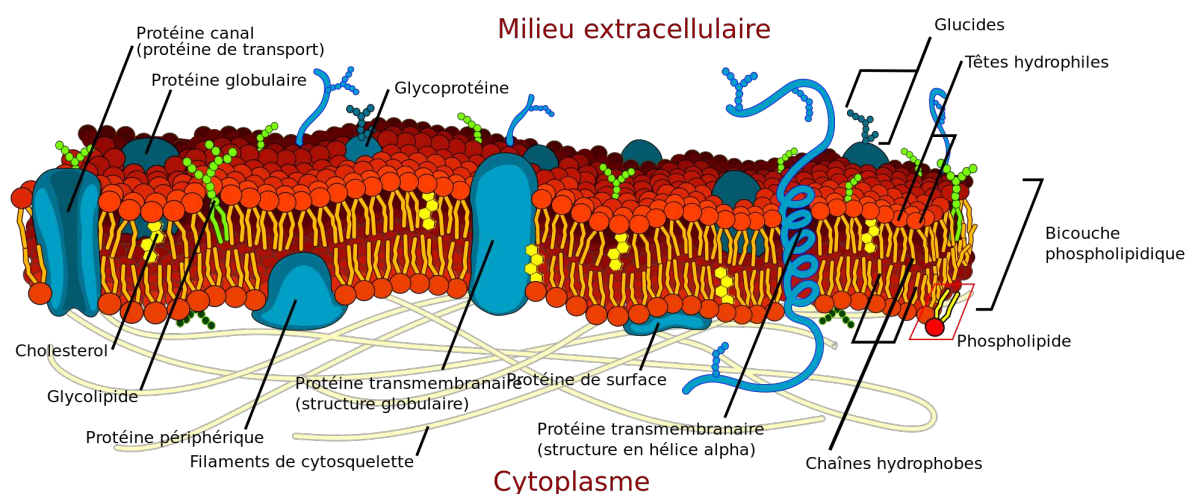


FIGURE 2.9 – Illustration de la composition d'une membrane plasmique. Tiré de wikipedia.org.

Examinons maintenant de plus près les deux éléments principaux qui composent les membranes cellulaires : les protéines intégrales et les lipides membranaires.

2.2.2 LES PROTÉINES INTÉGRALES

Les protéines intégrales (aussi connues sous le nom de protéines intrinsèques) sont des protéines qui traversent la membrane et interagissent avec cette dernière principalement au moyen d'interactions hydrophobes. Les protéines intégrales peuvent porter des

oligosaccharides (sucres) et dans ce cas elles sont appelées glycoprotéines. Localisées à l'interface entre le milieu interne et le milieu externe, les protéines intégrales ont souvent un rôle de communication et/ou de signalisation tels que les canaux, les pompes, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, *G Protein Coupled Receptors*). Ces dernières présentent un intérêt majeur pour les industries pharmaceutiques car elles sont la cible de plus de 50% des médicaments connus (Hopkins et Groom, 2002).

La quantité de protéines intégrales dans les membranes diffère d'une cellule à l'autre ainsi que d'un compartiment cellulaire à l'autre allant de 18% dans la membrane de la myéline des neurones à 75% dans la membrane interne des mitochondries (Tan *et al.*, 2008).

2.2.3 LES LIPIDES MEMBRANAIRES

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

Un lipide est une molécule amphiphile caractérisée par une partie polaire (la tête) et une partie apolaire (la queue). Le rapport de taille entre la tête et la queue définit la forme du lipide. Un lipide est en cône inversé si la tête est plus grande que la queue, de forme cylindrique si la tête et la queue sont de même taille ou de forme conique si la tête est plus petite que la queue (Figure 2.10).

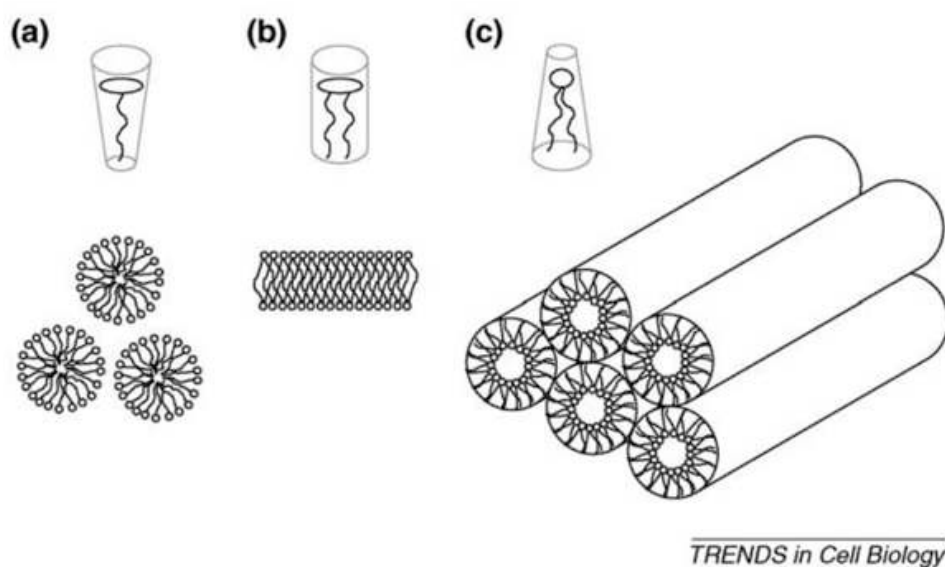


FIGURE 2.10 – Structures formées par les différentes formes de lipide. (a) Les lipides en cône inversé forment des micelles. (b) Les lipides cylindriques forment des bicouches. (c) Les lipides coniques forment une phase hexagonale inverse. Tiré de Janmey et Kinnunen (2006).

Les lipides étant insolubles dans l'eau en raison de leur queue hydrophobe, ils vont

s'auto-assembler de manière à minimiser l'exposition de leur partie hydrophobe avec le solvant. Plus précisément, les lipides en cône inversé vont s'assembler en micelles, les lipides cylindriques vont s'assembler en bicouche et les lipides coniques vont former une phase hexagonale inverse (Figure 2.10).

Dans un lipide, la queue est la partie la plus flexible tandis que la région entre la tête et la queue est la partie la plus rigide (Aussenac *et al.*, 2003). La queue hydrophobe peut contenir des insaturations (double liaison au lieu d'une simple) qui peuvent être en conformation *cis* ou *trans* comme illustré dans la Figure 2.11.

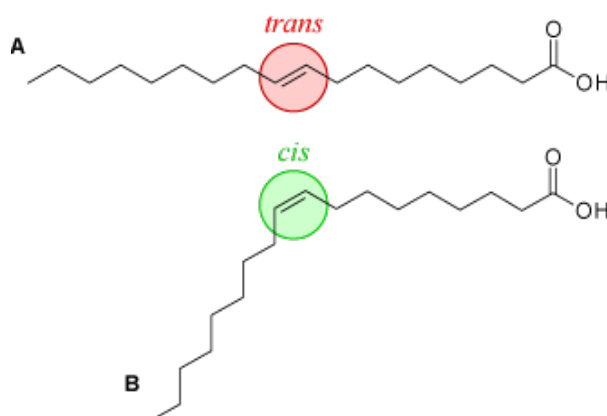


FIGURE 2.11 – Illustration d’une insaturation dans une chaîne aliphatique. A- conformation *trans* et B- conformation *cis*. Tiré de wikipedia.org.

Une insaturation en conformation *cis* (hydrogènes de même côté de la double liaison) crée un coude dans la chaîne aliphatique, tandis qu’une insaturation en conformation *trans* a une structure plutôt étendue (Figure 2.11). Les coudes dans les chaînes aliphatiques entraînent un écartement des têtes polaires comme illustré dans la Figure 2.12. Dans une telle situation on dit qu’il y a des défauts de *packing* dans les têtes polaires car les parties hydrophobes des lipides sont accessibles par l’eau.

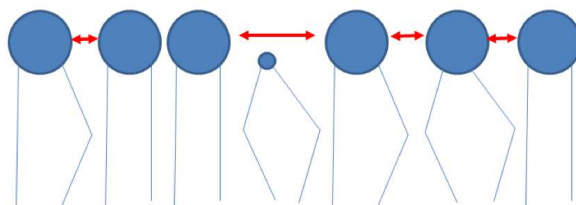


FIGURE 2.12 – Représentation schématisée des défauts de *packing*. Les défauts de *packing* sont représentés par les flèches rouges. Tiré de l’HDR (Habilitation à Diriger des Recherches) de Patrick Fuchs.

L’état physique des lipides dans une bicouche change considérablement sous l’effet de la température comme illustré dans la Figure 2.13. En dessous de la température de

transition de phase les lipides sont très ordonnés (la bicouche est rigide) tandis qu'au dessus de la température de transition de phase les lipides sont désordonnés (la bicouche est fluide). La température de transition de phase d'un lipide est directement liée au nombre d'insaturations car plus il y a d'insaturations, moins les chaînes sont serrées les unes contre les autres et donc plus la température de transition est basse (voir Tableau 2 en appendice).

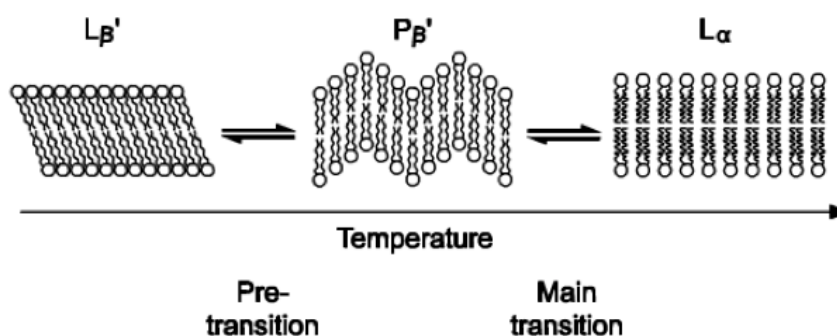


FIGURE 2.13 – Transition de phase dans une bicouche lipidique. $L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$ et L_{α} correspondent respectivement aux phases rigide, intermédiaire et fluide. Tiré de avantlipids.com.

Les membranes cellulaires sont composées d'une grande variété de lipides tels que les glycérophospholipides et les glycolipides (lipides portant un oligosaccharide) et de stérols tel que le cholestérol. Comme les glycérophospholipides sont les lipides les plus abondants, regardons maintenant leur composition.

LES GLYCÉROPHOSPHOLIPIDES

Un glycérophospholipide est un phospholipide constitué d'un squelette glycérol sur lequel sont attachées deux chaînes aliphatiques en positions 1 ($sn-1$) et 2 ($sn-2$) et un acide phosphorique en position 3 ($sn-3$) comme illustré dans la Figure 2.14. Les deux chaînes aliphatiques $sn-1$ et $sn-2$ forment la queue hydrophobe du glycérophospholipide et la chaîne $sn-3$, correspondant à l'acide phosphorique lié ou non à un composé hydroxylé (X), forme la tête polaire.

Selon le composé hydroxylé qui se fixe sur l'acide phosphorique, on obtient différentes classes de glycérophospholipides dont les têtes polaires sont chargées ou neutres (zwitterioniques) comme montré dans le Tableau 2.2.

De même, la longueur des chaînes aliphatiques et le nombre d'insaturations sont variables (Tableau 2.3).

Finalement, en combinant la diversité de composition de la tête polaire et de la queue hydrophobe, 1014 ($6 \times 13 \times 13$) glycérophospholipides différents peuvent être construits,

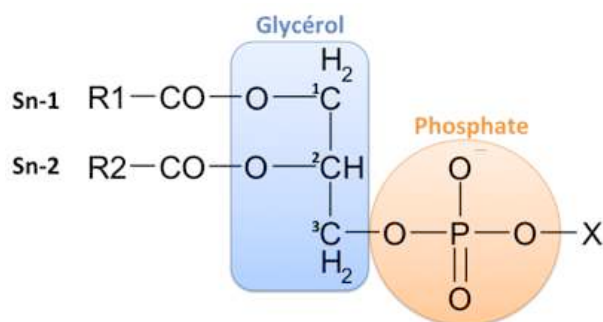


FIGURE 2.14 – Représentation d'un glycérophospholipide. R1 et R2 représentent les deux chaînes aliphatiques et X est le composé hydroxylé.

Composé hydroxylé		Classe de glycérophospholipide	Abréviation	Charge
Hydrogène	H	Acide phosphatidique	PA	négative
Choline		Phosphatidylcholine	PC	neutre
Éthanolamine	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Phosphatidyléthanolamine	PE	neutre
Sérine		Phosphatidylsérine	PS	négative
Glycérol		Phosphatidylglycérol	PG	négative
Inositol		Phosphatidylinositol	PI	négative

Tableau 2.2 – Classes de glycérophospholipides.

bien que seules certaines combinaisons existent dans la nature.

Parmi les glycérophospholipides, les lipides PC constituent la classe de lipides la plus abondante dans les membranes de mammifère et sont présents dans toutes les membranes des organismes eucaryotes (Figure 2.15).

Au sein d'une même cellule, il existe une grande différence de composition lipidique entre les membranes pré-Golgi (RE et du *cis*-Golgi) et post-Golgi (*trans*-Golgi et la membrane plasmique). Les membranes « pré-Golgi » sont symétriques (c'est-à-dire que

Nom de l'acide	Longueur de la chaîne : nombre d'insaturation (position-conformation)
Laurique	12 : 0
Myristique	14 : 0
Palmitique	16 : 0
Palmitoléique	16 : 1 (9- <i>cis</i>)
Stératique	18 : 0
Oléique	18 : 1 (9- <i>cis</i>)
Vaccénique	18 : 1 (11- <i>cis</i>)
Linoléique	18 : 2 (9- <i>cis</i> , 12- <i>cis</i>)
γ -Linoléique	18 : 3 (6- <i>cis</i> , 9- <i>cis</i> , 12- <i>cis</i>)
α -Linoléique	18 : 3 (9- <i>cis</i> , 12- <i>cis</i> , 15- <i>cis</i>)
Arachidique	20 : 0
Béhénique	22 : 0
Arachidonique	20 : 4 (5- <i>cis</i> , 8- <i>cis</i> , 11- <i>cis</i> , 14- <i>cis</i>)

Tableau 2.3 – Exemple de longueurs des chaînes aliphatiques avec ou non des insaturations.

la composition dans les deux feuillets est la même), contiennent peu de cholestérol, peu de lipides chargés et peu de lipides saturés (van Meer *et al.*, 2008). En revanche les membranes « post-Golgi » qui sont asymétriques, contiennent plus de cholestérol, plus de lipides chargés et plus de lipides saturés (van Meer *et al.*, 2008). L'abondance du cholestérol et des lipides saturés rend la membrane plus rigide et donc moins perméable au passage de molécules. Les membranes « pré-Golgi » sont dénommées membranes « précoces » par opposition à celles « post-Golgi ».

Cette composition lipidique propre à chaque compartiment cellulaire, mais aussi l'état physique (courbé, fluide, ordonné, etc) vont permettre aux protéines périphériques (voir section suivante) de cibler un compartiment cellulaire plutôt qu'un autre. Regardons donc maintenant comment les protéines périphériques interagissent avec les membranes cellulaires.

2.3 INTERACTIONS PROTÉINES PÉRIPHÉRIQUES-MEMBRANES

Contrairement aux protéines membranaires intégrales qui sont en permanence en interaction avec la membrane, les protéines périphériques sont attachées de manière transitoire à la membrane ou à des protéines intégrales par des interactions hydrophobes ou électrostatiques. Les protéines périphériques doivent donc être capables de cibler une membrane et de mettre en place des stratégies pour interagir avec elle. Les principaux mécanismes permettant aux protéines périphériques d'interagir avec la membrane sont illustrés dans la Figure 2.16.

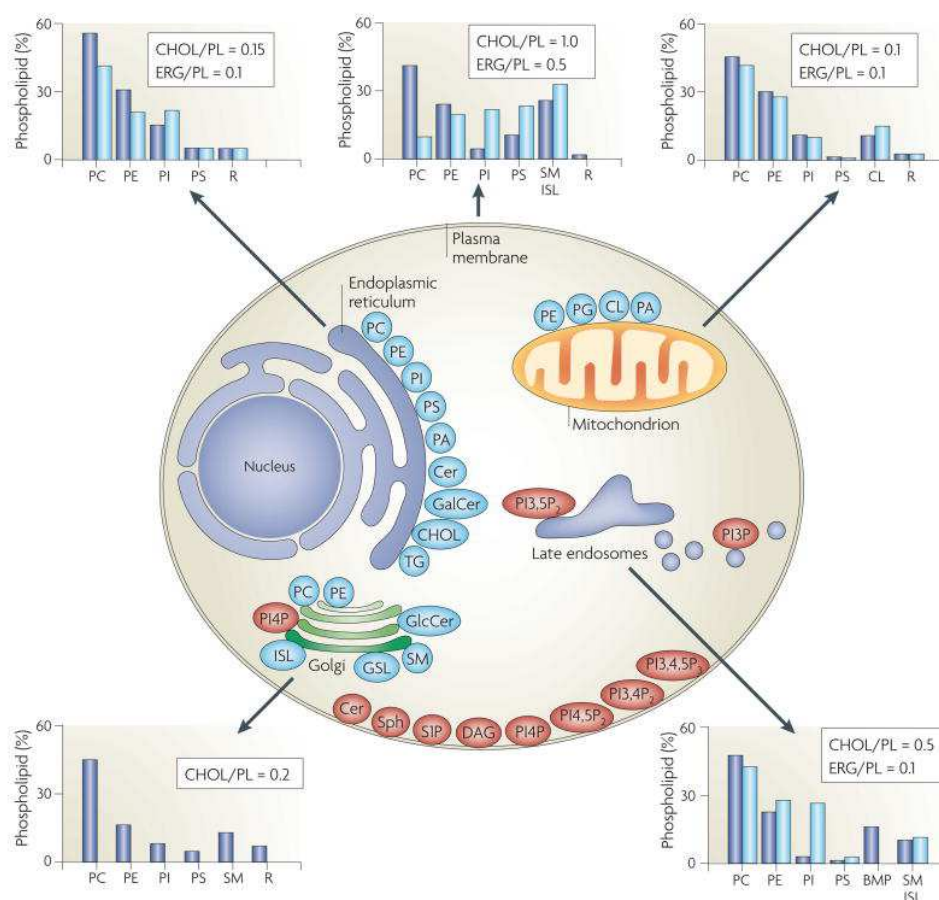


FIGURE 2.15 – Diversité des lipides au sein de la cellule. Les graphes en barre indiquent la composition lipidique à l'équilibre de chaque organite (bleu foncé pour les mammifères, bleu clair pour les levures). Sont indiqués également les rapports cholestérol/phospholipides (mammifères) et ergostérol/phospholipides (levures). Les ronds bleus représentent les sites de synthèse des différents lipides. Les ronds rouges indiquent les lipides impliqués dans les voies de signalisation (à noter que ces derniers représentent moins de 1% des lipides totaux). Tiré de van Meer *et al.* (2008).

Le premier mécanisme est la reconnaissance de la tête polaire d'un lipide particulier comme le phosphoinositide (PIP) à travers un domaine structuré (Lemmon, 2008), le deuxième est la pénétration dans la membrane d'une modification lipidique portée par la protéine (en général un acide gras estérifié sur un résidu) (Peitzsch et McLaughlin, 1993), le troisième est à travers l'adsorption d'une chaîne cationique à la surface de membranes contenant des lipides anioniques (Papayannopoulos *et al.*, 2005; Yeung *et al.*, 2006) et le dernier est à travers l'insertion d'une hélice amphipathique (Bigay *et al.*, 2005).

Dans l'ensemble de ce manuscrit, on définit l'**adsorption** d'une chaîne polypeptidique à la surface d'une membrane comme les premières interactions entre la chaîne polypeptidique et la membrane tandis que l'**insertion** (aussi connue sous le nom de **partitionnement**) d'une hélice comme l'enfouissement des chaînes latérales hydrophobes

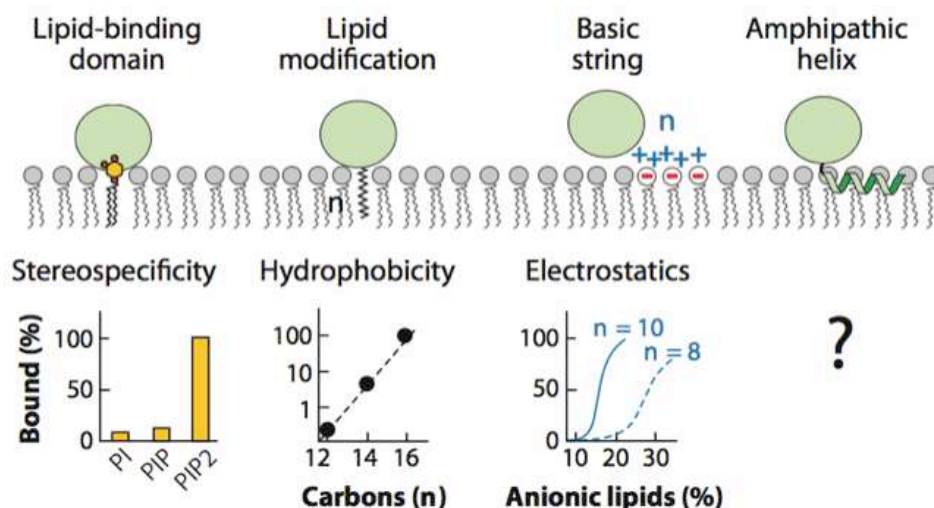


FIGURE 2.16 – Mécanismes utilisés par les protéines périphériques pour interagir avec les membranes. Tiré de Antony (2011).

dans les chaînes aliphatiques des lipides.

Les trois premières stratégies utilisées par les protéines périphériques sont principalement contrôlées respectivement par la stéréospécificité, l'hydrophobie et l'attraction électrostatique tandis que l'insertion d'une hélice amphipathique implique plusieurs forces due à la position de l'hélice dans la membrane (voir section 2.4.3).

Concentrons nous sur la dernière stratégie (insertion d'une hélice amphipathique) puisque c'est le mécanisme utilisé par le motif ALPS pour interagir avec la membrane.

2.3.1 INSERTION D'UNE HÉLICE AMPHIPATHIQUE

Une hélice amphipathique correspond à un repliement en hélice (en général hélice- α) pour laquelle on observe une ségrégation des résidus hydrophobes et hydrophiles dans deux faces, l'une polaire contenant les résidus hydrophobes et l'autre apolaire contenant les résidus hydrophiles.

Le partitionnement de l'hélice amphipathique dans l'interface de la membrane (White *et al.* (1998) et section 2.4.3) lui permet d'être sensible à de nombreux paramètres physico-chimiques de la membrane tels que la forme des lipides, la manière dont les lipides sont serrés les uns par rapport aux autres (le *packing* entre les lipides) et la charge des lipides.

Plusieurs protéines périphériques impliquées dans le transport interagissent avec les membranes à travers une hélice amphipathique. C'est le cas des protéines Arf1 et Arf-GAP1 pour le transport vers le RE, de Sar1 pour le transport vers le Golgi et de l'épsine et de l'amphiphysine pour le transport vers l'intérieur de la cellule (endocytose).

Prenons l'exemple de la protéine Sar1 qui est un élément du manteau protéique CO-PII. La protéine Sar1-GTP (conformation liée au Guanosine Triphosphate (GTP), forme

active) vient se lier à la membrane à travers l'insertion d'une hélice amphipathique. L'insertion de l'hélice d'un côté de la membrane provoque une différence d'aire entre les deux feuilletts, ce qui courbe localement la membrane. Toutefois, l'insertion de l'hélice amphipathique à elle seule n'est pas suffisante pour faire bourgeonner la membrane. Le domaine N-BAR de l'amphiphysine, qui est retrouvé exclusivement dans les membranes « post-golgiennes » utilise à la fois l'insertion de son hélice amphipathique, sa forme concave et sa surface basique pour induire la courbure membranaire (Peter *et al.*, 2004).

D'autres hélices amphipathiques sont capables de sentir la courbure membranaire. C'est le cas par exemple du motif ALPS de ArfGAP1 (Bigay *et al.*, 2005), protéine impliquée dans le désassemblage du manteau protéique *Coat Protein I* (COPI) et de l'hélice amphipathique de l' α -synucléine (Davidson *et al.*, 1998; Nuscher *et al.*, 2004; Ouberaï *et al.*, 2013), protéine jouant un rôle central dans la maladie de Parkinson (Auluck *et al.*, 2010).

Enfin, il est important de noter que certaines caractéristiques des hélices amphipathiques reflètent une adaptation aux membranes sur lesquelles elles agissent. Par exemple, le motif ALPS (contenant de gros résidus hydrophobes sur sa face apolaire et de petits résidus chargés sur sa face polaire) se lie sur des membranes neutres alors que l' α -synucléine (contenant de nombreux résidus chargés sur sa face polaire et peu de gros hydrophobes sur sa face apolaire) se lie sur des membranes anioniques (Pranke *et al.*, 2011). Examinons donc maintenant la physico-chimie des hélices amphipathiques.

2.4 PHYSICO-CHIMIE DES HÉLICES AMPHIPATHIQUES

2.4.1 LES HÉLICES AMPHIPATHIQUES

Les hélices amphipathiques sont retrouvées dans les protéines périphériques (comme nous l'avons vu dans la partie 2.3.1) mais aussi dans de nombreux peptides qui interagissent avec les membranes.

Les peptides se distinguent des protéines par l'absence d'un coeur hydrophobe et leur longueur est assez variable entre 5 et 50 résidus. Les peptides qui interagissent avec les membranes sont par exemple les peptides antimicrobiens, *Antimicrobial Peptide* (AMP) et les peptides synthétisés *de novo*, *Cell Penetrating Peptide* (CPP).

Les AMP sont des molécules impliquées dans l'immunité innée car elles contribuent à la première ligne de défense des organismes multicellulaires animaux et végétaux (Ganz et Lehrer, 1998; Hoffmann *et al.*, 1999; Lehrer et Ganz, 1999). Ce sont de courts peptides (<30 acides aminés) cationiques qui perméabilisent les membranes en induisant la mort de la cellule (Leontiadou *et al.*, 2006; Zasloff, 2002). Bien que les mécanismes d'action des AMP ne soient pas encore complètement établis beaucoup d'hypothèse proposent la

formation de pores stables dans la membrane (Yang *et al.*, 2000).

Les CPP sont de courts peptides cationiques capables de traverser les membranes mais contrairement aux AMP ils n'induisent pas la mort de la cellule (Koren et Torchilin, 2012). De plus, comme les CPP n'ont besoin ni d'énergie ni de récepteur pour traverser les membranes, ils présentent une stratégie prometteuse pour le transport de molécules actives dans les cellules.

En raison de leur caractère cationique, les AMP vont pouvoir interagir préférentiellement avec la membrane anionique externe de certains types bactériens (Zasloff, 2002). Les CPP, également cationiques, ciblent quant à eux la membrane plasmique des cellules eucaryotes (Zigoneanu et Pielak, 2012) dont le feuillet externe est cependant extrêmement pauvre en lipides anioniques. Une interaction entre CPP et sucres complexes de surface est sans doute l'étape transitoire nécessaire pour l'entrée de ces peptides dans les cellules.

De manière intéressante, beaucoup d'hélices amphipathiques sont non structurées en solution et adoptent une conformation en hélice- α une fois au contact de la membrane (Almeida et Pokorny, 2009; Bigay *et al.*, 2005; White *et al.*, 1998). La liaison d'une hélice amphipathique à la surface de la membrane peut être décrite en trois étapes thermodynamiques : attraction, adsorption et repliement (Figure 2.17).

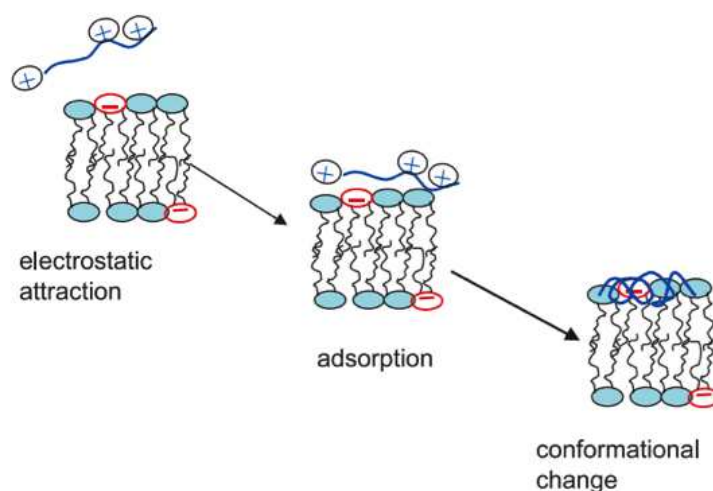


FIGURE 2.17 – Étapes pour la liaison d'une hélice amphipathique cationique à la surface d'une membrane anionique. 1) attraction électrostatique d'une chaîne cationique sur une membrane anionique, 2) adsorption de la chaîne cationique à la surface de la membrane, 3) insertion/repliement en hélice de la chaîne cationique dans l'interface membrane/eau. Tiré de Seelig (2004).

La première étape correspond à l'attraction de la chaîne polypeptidique sur la membrane. Dans le cas d'une séquence cationique, elle est initiée par l'attraction électrostatique sur des membranes anioniques tandis qu'une séquence de charge totale neutre

interagit avec des membranes neutres principalement au travers d'interactions hydrophobes.

La seconde étape est l'adsorption de la chaîne polypeptidique à la surface de la membrane, correspondant aux premières interactions entre la chaîne polypeptidique et la membrane. Sa localisation exacte dépend de la balance hydrophobe/hydrophile des groupes moléculaires et des forces impliquées.

La dernière étape est l'insertion et le repliement de la chaîne polypeptidique en hélice- α dans l'interface membrane/eau. L'hélice se forme car la formation de ses liaisons hydrogène est plus favorisée dans l'interface membrane/eau que dans l'eau (Wimley et White, 1996).

2.4.2 PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES POUR DÉCRIRE LES HÉLICES AMPHIPATHIQUES

En 1967, Schiffer et Edmundson ont proposé de représenter l'amphiphilicité d'une hélice par une « roue hélicoïdale » : projection sur un plan orthogonal à cette hélice (Schiffer et Edmundson, 1967). Alors les projections des chaînes latérales des résidus sont réparties sur un cercle tous les 100° (car il y a 3,6 résidus par tour dans une hélice- α). Ainsi, lorsque l'hélice est amphipathique, les résidus apolaires sont principalement d'un côté de la roue et les résidus polaires et chargés de l'autre côté comme illustré dans la Figure 2.18.

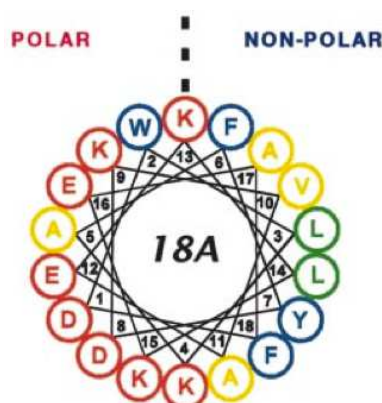


FIGURE 2.18 – Représentation de la séquence d'une hélice en roue hélicoïdale. La face polaire contient en majorité des résidus chargés (K : lysine, R : glutamate, D : aspartate) et la face apolaire contient majoritairement des résidus hydrophobes (F : phenylalanine, A : alanine, V : valine, L : leucine) Tiré de Hristova *et al.* (1999).

Dans les années 80, Eisenberg *et al.* ont proposé de quantifier l'amphipathicité d'une hélice (*i.e.* son caractère amphipathique), par le moment hydrophobe hélicoïdal moyen (connu sous le nom de moment hydrophobe) (Eisenberg *et al.*, 1982) :

$$\langle \mu_H \rangle = \frac{\left| \sum_{i=1}^N \mathbf{H}_i \right|}{N}$$

où \mathbf{H}_i est un vecteur qui a pour origine le centre de l'hélice et qui va dans la direction du résidu i ; la norme $|\mathbf{H}_i|$ correspond à la valeur d'hydrophobie selon l'échelle d'Eisenberg. Ainsi, une valeur importante de $\langle \mu_H \rangle$ signifie que l'hélice est amphipathique perpendiculairement à son axe, en d'autres termes que l'hélice présente deux faces (polaire et apolaire) bien définies.

Selon Drin et Antonny (2010), les paramètres d'Eisenberg et la représentation en roue hélicoïdale ont été des outils essentiels dans le passé pour montrer que les propriétés physico-chimiques et structurales des hélices amphipathiques dictent leur capacité à se lier aux membranes mais également leurs activités (formation de pores, translocation, ...). Ces outils descriptifs restent toujours d'actualité. Toutefois, ils mentionnent que seules des approches au niveau atomique, comme la DM qui permet de réellement définir la nature des interactions locales entre lipides et hélices amphipathiques, sont désormais nécessaires pour mieux définir le fonctionnement d'une hélice comme ALPS.

Pour décrire l'hydrophobie des résidus dans l'interface membrane/eau, Wimley et White ont développé une échelle basée sur le partitionnement des 20 acides aminés naturels dans une interface membrane/eau (Wimley et White, 1996) (Figure 2.19).

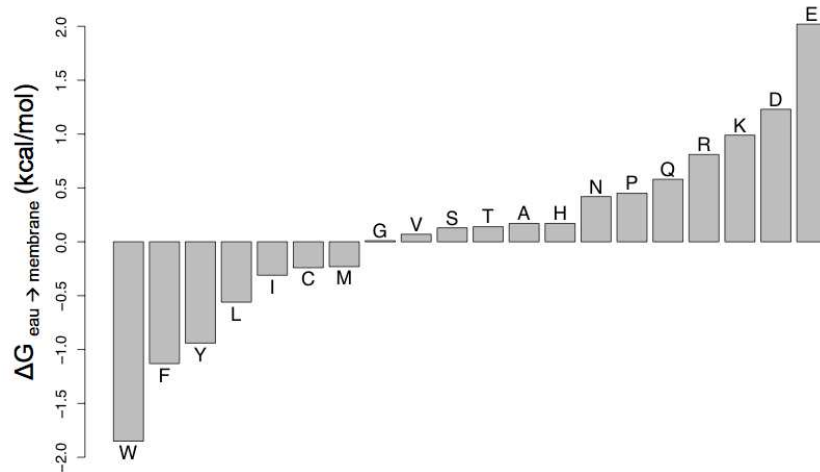


FIGURE 2.19 – Hydrophobie interfaciale des 20 acides aminés naturels dans une membrane de POPC. L'axe des ordonnées représente l'énergie libre de transfert ΔG de chaque résidu de l'eau vers la membrane. Les données sont tirées de Wimley et White (1996).

Basée sur l'énergie libre de transfert (ΔG) d'un résidu entier (squelette peptidique + chaîne latérale) de l'eau à la membrane, cette échelle fournit des informations sur les

principes gouvernant l'énergie d'insertion d'un résidu (localisé dans une séquence non structurée) dans l'interface membrane/eau. Plus le ΔG est bas, plus le résidu préfère être dans l'interface et plus le ΔG est haut, plus le résidu préfère être dans l'eau.

Wimley et White montrent que les résidus aromatiques (W : tryptophane, F : phénylalanine et Y : tyrosine) préfèrent être à l'interface membrane/eau tandis que les résidus chargés (E : glutamate, D : aspartate, K : lysine, R : arginine) préfèrent être dans l'eau.

Ainsi, cette échelle permet d'estimer l'énergie libre associée à l'insertion d'un peptide dans une conformation non structurée dans l'interface de la membrane.

2.4.3 PARTITIONNEMENT D'UNE HÉLICE AMPHIPATHIQUE DANS LA MEMBRANE

Comme nous l'avons vu dans la partie 2.4.2, une hélice amphotérique se caractérise par une face polaire contenant les résidus hydrophiles et une face apolaire contenant les résidus hydrophobes.

Des expériences de diffraction aux rayons X ont permis de déterminer le positionnement et l'orientation d'une hélice amphotérique modèle dans une membrane, comme représenté dans la Figure 2.20 (Hristova *et al.*, 1999). L'hélice amphotérique se partitionne parallèlement au plan de la membrane au niveau des glycérols des lipides en orientant sa face polaire vers le solvant et sa face apolaire vers les chaînes aliphatiques des lipides.

Au vu du partitionnement de l'hélice amphotérique dans la membrane, on comprend bien qu'elle va être capable de sentir de nombreuses propriétés telles que la charge et le *packing* entre les lipides.

2.4.4 ÉNERGIE LIBRE DE PARTITIONNEMENT D'UNE HÉLICE AMPHIPATHIQUE DANS LA MEMBRANE

Nous avons vu dans la section 2.4.1 que la liaison d'une hélice amphotérique dans l'interface membrane/eau pouvait être décrite en trois étapes : attraction, adsorption et partitionnement/repliement.

Selon White *et al.* (1998), la liaison d'une hélice amphotérique dans l'interface membrane/eau se décompose en deux étapes : 1) partitionnement du peptide en conformation non structurée dans l'interface puis 2) repliement du peptide en hélice- α dans l'interface, comme illustré dans la Figure 2.21. White a nommé ce phénomène couplage partitionnement/repliement.

L'énergie libre associée au partitionnement du peptide en hélice dans l'interface membrane/eau est la somme de l'énergie libre de partitionnement du peptide en conformation non structurée et de l'énergie libre de repliement du peptide en hélice.

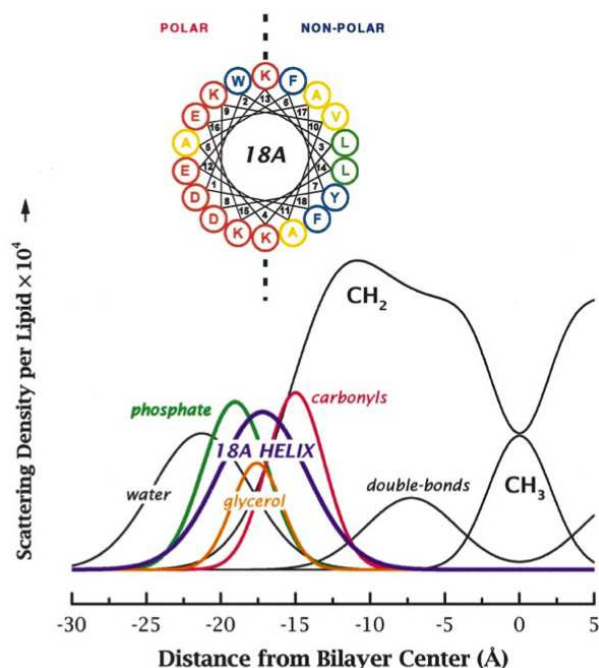


FIGURE 2.20 – Partitionnement d’une hélice amphipathique (Ac-18A-NH₂) dans une bicouche de DOPC. La figure du haut représente la séquence de l’hélice en roue hélicoïdale montrant la face polaire et la face apolaire. Le code couleur des résidus correspond à l’échelle d’hydrophobie interfaciale établie par Wimley et White (Wimley et White, 1996) et la ligne en pointillés indique l’axe central de l’hélice. La figure du bas, représente la densité du peptide en violet, de l’eau en noir, des phosphates en vert, des glycérols en orange, des carbonyls en rouge et des chaînes aliphatiques en noir. Tiré de Hristova *et al.* (1999).

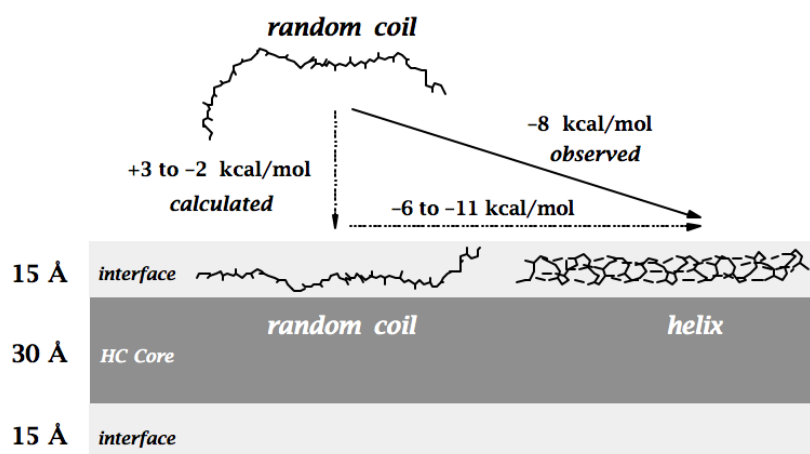


FIGURE 2.21 – Cycle thermodynamique de la liaison d’un peptide interfacial dans la membrane. L’énergie libre associée au partitionnement du peptide en hélice dans l’interface membrane/eau se décompose en deux étapes : 1) partitionnement du peptide en conformation non structurée dans l’interface puis 2) repliement du peptide en hélice- α dans l’interface. Tiré de White *et al.* (1998).

Alors que partitionnement de l'hélice dans l'interface de la membrane peut être estimé par des techniques expérimentales (CD, fluorescence ou flottaison) et décrit par DM, l'étape de partitionnement du peptide non structuré dans l'interface suivi de son repliement en hélice ne peut être estimée expérimentalement de manière triviale. C'est pour cette raison que dans ce travail nous avons couplé la DM aux expériences de CD pour examiner la liaison du motif ALPS dans l'interface de la membrane.

Le cycle thermodynamique de White *et al.* (1998) a depuis été mis à jour afin de prendre en compte un ensemble de conformations, repliées en hélice et non structurées, dans l'eau Almeida *et al.* (2012). Néanmoins pour notre étude nous avons préféré travailler avec le cycle thermodynamique de White *et al.* (1998) pour une première exploration.

2.5 LE MOTIF ALPS

2.5.1 LE MOTIF ALPS DANS LA PROTÉINE ARFGAP1

Nous avons vu dans la partie 2.1.2 que la liaison de la protéine ArfGAP1 à la surface d'une vésicule naissante est couplée à son activité GTPasique (hydrolyse du GTP en Guanosine Diphosphate (GDP)) sur la protéine Arf1.

En 1997, Antonny *et al.* ont observé que l'activité GTPasique de la protéine ArfGAP1 augmentait quand des lipides coniques étaient introduits au détriment de lipides cylindriques dans de grands liposomes, *Large Unilamellar Vesicles* (LUV), c'est-à-dire où localement la membrane est plate (Antonny *et al.*, 1997).

Quelques années plus tard, Bigay *et al.* ont observé que l'activité de la protéine ArfGAP1 augmentait lorsque le rayon des liposomes diminuait (de 150 à 30 nm) tout en conservant la même composition lipidique (Bigay *et al.*, 2003).

Au vu de ces deux observations, Antonny *et al.* ont suggéré que la protéine ArfGAP1 était en fait sensible aux défauts de *packing* entre les lipides induits par la courbure de la membrane (Bigay *et al.*, 2003).

Dans une membrane plate composée de lipides cylindriques (tête et queue de même taille), les têtes polaires des lipides sont serrées les unes aux autres afin de minimiser l'exposition des queues hydrophobes des lipides au solvant. Maintenant si la membrane se courbe (en diminuant le rayon du liposome), les têtes polaires des lipides du feuillet externe vont s'écarter les unes des autres afin de s'adapter à la forme convexe de la membrane, créant ainsi des défauts de *packing* entre les têtes polaires. Antonny *et al.* proposent que de tels défauts sont retrouvés dans une membrane plate composée de lipides cylindriques et coniques car la différence de forme entre ces deux types de lipide va induire plus d'espace entre les têtes polaires.

Bigay *et al.* (2005) ont découvert que la région de la protéine ArfGAP1 qui se liait à la

membrane était une région d'environ 40 acides aminés qu'ils nommèrent ALPS pour *Amphipathic Lipid Packing Sensor*, en raison de son hypersensibilité aux défauts de *packing* entre les lipides (Figure 2.22).

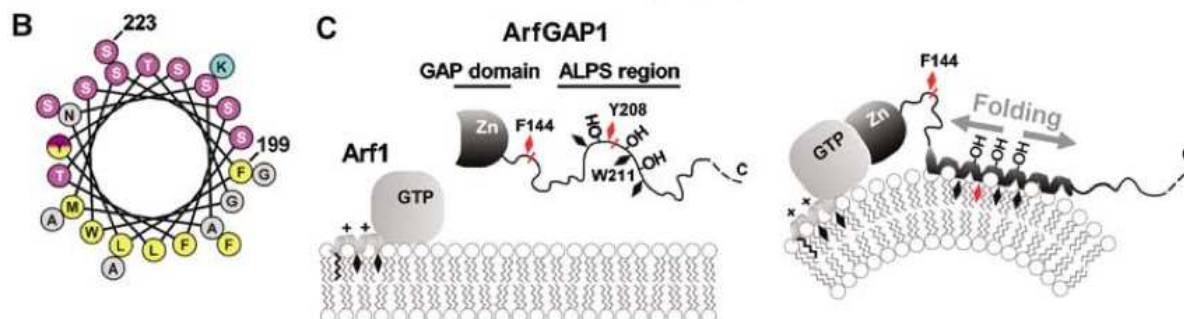


FIGURE 2.22 – Adsorption du motif ALPS à la surface d’une membrane courbée. À gauche, la séquence du motif ALPS représentée en roue hélicoïdale avec les petits résidus polaires en mauve, les résidus chargés en bleu, les gros résidus hydrophobes en jaune et les petits résidus hydrophobes en gris. Au centre, vue schématique de la protéine ArfGAP1 à proximité d’une membrane plate. Le motif ALPS de la protéine ArfGAP1 est non structuré. À droite, insertion du motif ALPS de la protéine ArfGAP1 dans l’interface de la membrane courbée. Le motif ALPS est maintenant replié en hélice amphipathique. Tiré de Bigay *et al.* (2005).

Les expériences de CD révèlent que le motif ALPS est non structuré dans l’eau et se replie en hélice amphipathique à la surface de membranes très courbées. L’hélice amphipathique du motif ALPS diffère des hélices amphipathiques classiques telles que celles des peptides AMP par le manque de résidus chargés et donc l’abondance de petits résidus polaires (essentiellement des sérines et thréonines) sur la face polaire et l’abondance de gros résidus hydrophobes (leucines, tryptophane, méthionine, phénylalanines et tryptophanes) sur la face apolaire.

En 2007, Mesmin *et al.* ont identifié un second motif dans la protéine ArfGAP1 (Figure 2.23) dont les propriétés physicochimiques sont similaires à celles du premier motif ALPS (Mesmin *et al.*, 2007). Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons la dénomination ALPS pour évoquer le premier motif ALPS découvert et la dénomination ALPS2 pour parler du second motif ALPS. Le motif ALPS2, se replie également en hélice amphipathique à la surface des membranes courbées. Toutefois, les résultats montrent que le motif ALPS est nécessaire dans l’interaction de ArfGAP1 avec les membranes et que le rôle du motif ALPS2 est de renforcer cette interaction. Il y a donc une coopération des motifs ALPS et ALPS2 pour l’interaction de ArfGAP1 avec la membrane.

De manière intéressante, le remplacement de gros résidus hydrophobes en petits résidus hydrophobes affecte fortement l’avidité du motif ALPS pour des membranes lipidiques, quelles soient de courbure faible ou fortement positive (Bigay *et al.*, 2005). De ce

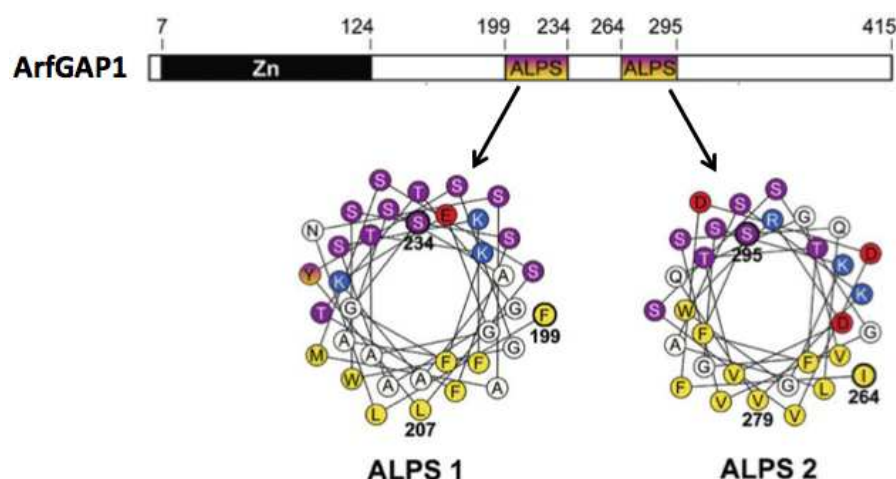


FIGURE 2.23 – Identification du second motif ALPS dans la protéine ArfGAP1. Tiré de Mesmin *et al.* (2007).

fait, le motif ALPS ne peut évidemment plus agir comme un senseur de courbure. Ceci est à distinguer de la situation où le motif ALPS se lie à toutes les membranes qu'elles soient planes ou courbées suite à l'ajout de résidus chargés sur sa face polaire (Drin *et al.*, 2007). Nous parlerons à ce moment réellement d'un motif ALPS qui bien que capable de lier les membranes devient insensible à la courbure. Un autre point intéressant issu de Bigay *et al.* (2005) à mentionner est que la présence ou non de lipides anioniques dans la membrane n'a que peu d'effet sur la liaison du motif ALPS aux membranes. C'est deux éléments expérimentaux envoient un message important : l'interaction du motif ALPS aux membranes est essentiellement basée sur des interactions hydrophobes.

Au vu de la perte de la sensibilité à la courbure suite à l'ajout de résidus chargés sur la face polaire de ALPS, on pourrait croire que la sensibilité à la courbure est due seulement au manque de résidus chargés. Toutefois, l' α -synucléine (protéine impliquée dans la maladie de Parkinson) présente de nombreux résidus chargés sur sa face polaire et est elle aussi sensible à la courbure membranaire (Ouberaï *et al.*, 2013; Pranke *et al.*, 2011). Par conséquent, à la fois le manque de résidus chargés, l'abondance de petits résidus polaires et la présence de gros résidus hydrophobes sont à considérer pour comprendre la sensibilité à la courbure du motif ALPS.

2.5.2 LE MOTIF ALPS DANS LES AUTRES PROTÉINES

Nous avons vu dans la partie précédente que le motif ALPS se distingue des hélices amphipathiques classiques par le déséquilibre entre sa face polaire (pauvre en résidus chargés et riche en petits résidus polaires) et sa face apolaire (riche en gros résidus hydrophobes).

Pour savoir si d'autres protéines connues contiennent un motif ALPS, Gautier *et al.*

ont développé le programme HELIQUEST (Gautier *et al.*, 2008) pour rechercher dans les banques de données (*e.g.* SWISSPROT), toutes les séquences protéiques similaires au motif ALPS de ArfGAP1 en terme de composition et de physico-chimie. Contrairement aux programmes classiques fondés sur un alignement de séquences, le programme HELIQUEST prend en compte plusieurs critères tels que l'hydrophobie, le moment hydrophobe, la charge nette et la composition en acides aminés (un nombre maximum de résidus chargés et un nombre minimum de petits résidus polaires).

En prenant en compte tous ces critères, les auteurs ont obtenu 400 résultats dont trois protéines qui ont été testées expérimentalement (Drin *et al.*, 2007) (Figure 2.24). Les trois protéines testées sont GMAP-210, une protéine humaine géante possédant une longue partie en *coiled-coil* (Infante *et al.*, 1999), Nup133, une protéine humaine du complexe du pore nucléaire (Berke *et al.*, 2004) et Kes1 (aussi connue sous le nom de Osh4p), une protéine de levure impliquée dans le transport intracellulaire du stérol (Raychaudhuri *et al.*, 2006; de Saint-Jean *et al.*, 2011). Ces trois protéines ont un motif ALPS non structuré en solution et qui adopte une conformation en hélice en présence de liposomes très courbés (Drin *et al.*, 2007).

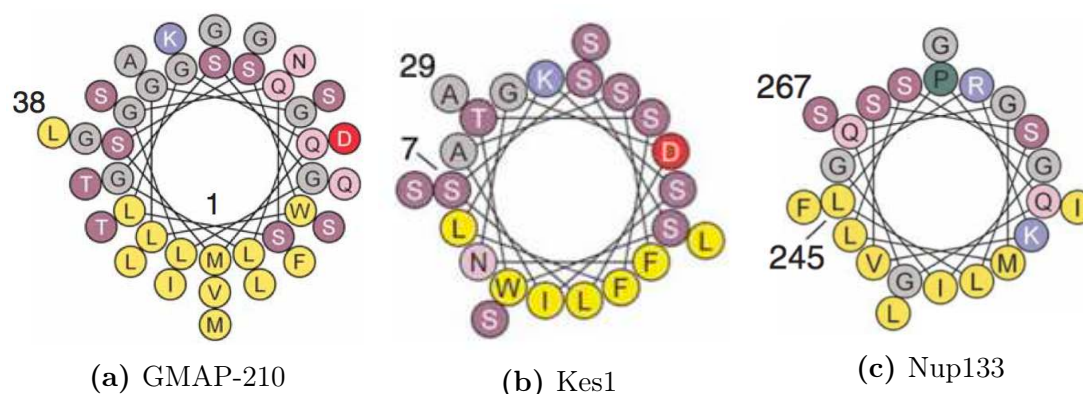


FIGURE 2.24 – Représentation en roue hélicoïdale des motifs ALPS de GMAP-210, Kes1 et Nup133. Le code couleur est le même que dans Figure 2.22. Tiré de Drin *et al.* (2007).

La protéine GMAP-210, impliquée dans le transport intracellulaire des voies de sécrétion précoces (Cardenas *et al.*, 2009), est connue pour attacher les vésicules aux saccules du Golgi grâce à son domaine *GRIP-related Arf-binding domain* (GRAB) (Drin *et al.*, 2008). La région N-terminale (N-ter) de la protéine, où est localisé le motif, est connue pour se lier sur les membranes du Golgi purifiées (Infante *et al.*, 1999).

La protéine Kes1 a pour fonction de transporter le stérol à travers les compartiments cellulaires (Raychaudhuri *et al.*, 2006). La structure de cette protéine a été résolue par cristallographie et est disponible dans la base de données *Protein Data Bank* (PDB) sous le code 1ZHZ. Le motif ALPS est localisé dans la région N-ter de la protéine couvrant la

poche de liaison du stérol.

La protéine Nup133 appartient au sous complexe Nup107-160 qui est localisé dans la région équatoriale du pore nucléaire, où les membranes interne et externe fusionnent (Belgareh *et al.*, 2001). La structure cristallographique de cette protéine a été déposée dans la PDB sous le code **1XKS** mais le motif ALPS qui est localisé dans une boucle exposée n'a pas pu être résolu.

De manière remarquable, ces protéines sont impliquées dans les voies de sécrétion précoces et dans l'enveloppe nucléaire, et contiennent un motif ALPS dans leur séquence qui reconnaît la courbure membranaire (Doucet *et al.*, 2010; Drin *et al.*, 2007). Bien que la séquence exacte de ces trois motifs diffère du motif ALPS original issu de la protéine ArfGAP1, leur sensibilité à la courbure membranaire reste la même. De plus, comme pour les motifs ALPS et ALPS2, ces trois motifs ALPS sont non structurés en solution et se replient en hélices amphipathiques uniquement à la surface de liposomes très courbés.

Le motif ALPS a été identifié dans d'autres protéines comme par exemple la synapsine qui est impliquée dans la fusion des vésicules synaptiques (Krabben *et al.*, 2011) et la protéine Barkor qui est nécessaire pour la formation de l'autophagosome durant l'autophagie (Wilz *et al.*, 2011). Là encore, le motif ALPS se lie préférentiellement sur des membranes courbées, c'est-à-dire sur des membranes contenant des défauts de *packing* entre les lipides.

3

Matériels et méthodes

La dynamique moléculaire (DM) est la technique principale utilisée dans ce travail. La DM est une technique puissante pour étudier des processus moléculaires au niveau atomique tels que les interactions protéines-lipides, le repliement des protéines, la courbure et la fusion des membranes ... Les simulations de DM facilitent l'interprétation des données expérimentales, donnent accès à des informations qui ne sont pas directement accessibles expérimentalement et sont utilisées par exemple en cristallographie aux rayons X et en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour la détermination de structures au niveau atomique.

3.1 PRINCIPE DES SIMULATIONS DE DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE

La DM consiste à simuler, par des moyens informatiques, le comportement de molécules au cours du temps : de la femtoseconde (10^{-15} s) pour le mouvement le plus rapide (vibration des liaisons) jusqu'à la milliseconde (10^{-3} s) pour les processus les plus lents (repliement de protéines). La Figure 3.1 montre les résolutions temporelle et spatiale des simulations de DM par rapport aux expériences.

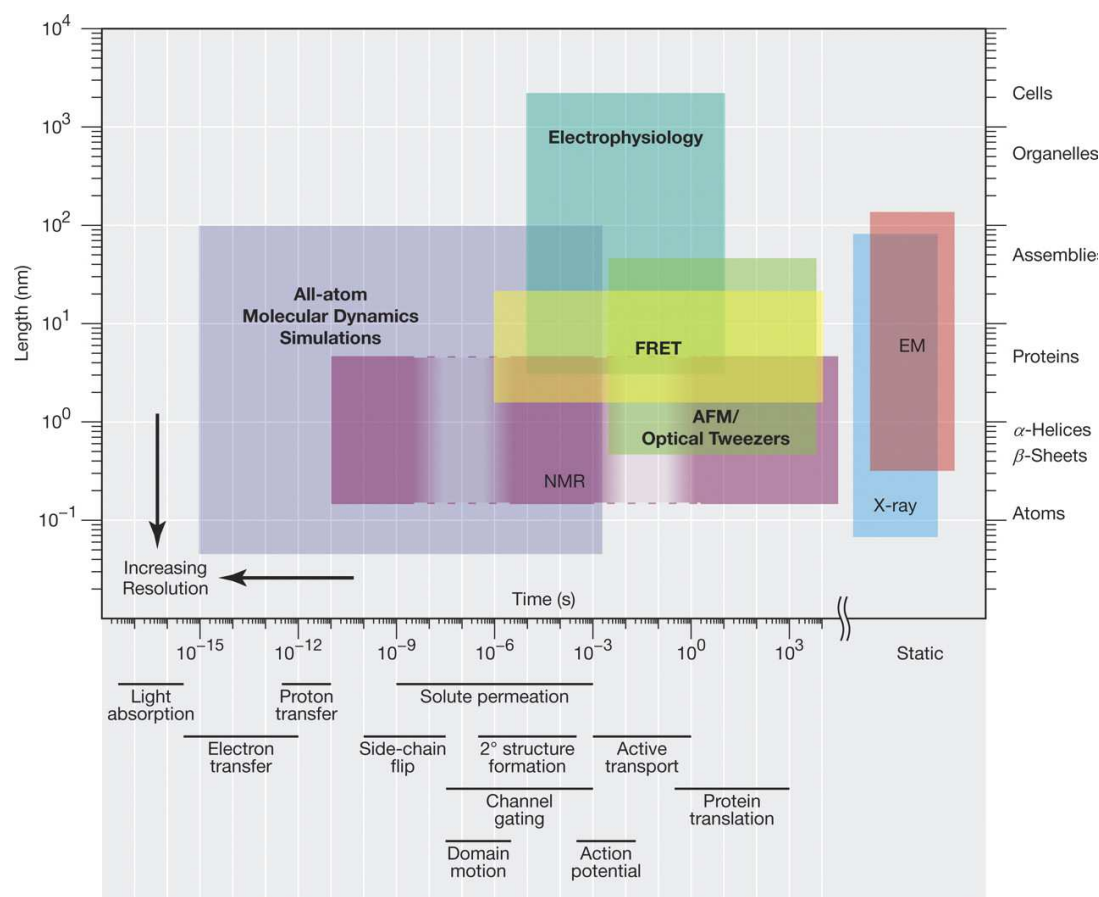


FIGURE 3.1 – Résolutions spatiotemporelles de plusieurs techniques biophysiques. Les résolutions temporelles (en abscisses) et spatiales (en ordonnées) de chaque technique sont indiquées par un rectangle de couleur. L'axe à droite indique les objets que chaque technique peut explorer. Les techniques sont : AFM pour microscopie à force atomique, EM pour microscopie électronique, fluorescence de type FRET pour transfert d'énergie par résonance de type Förster, NMR pour résonance magnétique nucléaire, X-ray pour diffusion aux rayons X. Les échelles de temps de certains processus biologiques sont représentées en dessous de l'axe des abscisses. Tiré de Dror *et al.* (2010).

Les simulations de DM nécessitent :

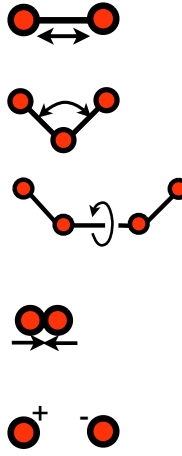
- un champ de forces pour décrire les interactions entre les particules et ainsi calculer à partir de l'énergie potentielle du système, les forces agissant sur les particules,
- un algorithme pour déplacer les particules au cours du temps sous l'effet de ces forces,
- des conditions périodiques pour mimer un environnement infini,
- un contrôle de la température et de la pression du système pour mimer les conditions expérimentales,
- un algorithme pour traiter les interactions longues portées.

Regardons maintenant un à un chacun de ces points en commençant par le champ de

forces empirique.

3.1.1 CHAMP DE FORCES EMPIRIQUE

Un champ de forces empirique est un jeu de paramètres décrivant les interactions entre tous les atomes du système, auquel est associée une expression analytique de l'énergie potentielle (Équation 1). L'énergie potentielle est fonction des positions (\mathbf{r}_i) des atomes i du système et est fondée sur le postulat que plus l'énergie potentielle est basse, plus le système est stable.

$$\begin{aligned}
 V_{\text{potentielle}} = & \sum_{\text{liaisons}} \frac{k}{2} (l - l_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{angles}} \frac{k}{2} (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{dièdres}} \sum_{m=1}^M \frac{V_m}{2} [1 + \cos(m\omega - \gamma)] \\
 & + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i}^N 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
 & + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}
 \end{aligned}$$


Équation 1 – Équation de l'énergie potentielle.

Un champ de forces empirique est constitué de deux principales composantes : l'une décrivant les interactions entre atomes liés par une liaison covalente ou même deux (tels que les liaisons, les angles de valences, les angles dièdres et les angles impropres) et l'autre traitant les interactions non-liées (interactions électrostatiques entre points chargés et interactions de van der Waals). À noter qu'il y a aussi un terme pour les angles impropres (qui n'apparaît pas dans l'équation 1) permettant de maintenir la planarité des cycles aromatiques ou la chiralité des atomes.

Il n'existe pas de champ de forces unique capable de décrire toutes les familles de macromolécules (protéine, lipide, polymère, etc.) mais plutôt plusieurs champs de forces spécifiques de certaines macromolécules. De même, pour décrire une même macromolécule différents types de champs de forces ont été développés à partir de différentes données expérimentales (d'où le nom de champ de forces empirique). Le Tableau 3.1 est une liste non exhaustive des champs de forces utilisés pour l'étude des macromolécules biologiques où :

Nom	Niveau de détail	Protéine	Lipide	ADN/ARN
OPLS-AA	Tout-atome	+	-	-
CHARMM	Tout-atome	+	+	-
AMBER	Tout-atome	+	-	+
OPLS-UA	Atome-unifié	+	-	-
Gromos	Atome-unifié	+	+	-
Berger	Atome-unifié	-	+	-
Martini	Gros-grain	+	+	+
OPEP	Gros-grain	+	-	+
Deserno	Gros-grain	+	+	-

Tableau 3.1 – Les champs de force communs pour les protéines, lipide et acides nucléiques.

- les champs de forces tout-atome (AA) traitent tous les atomes y compris les atomes d’hydrogène,
- les champs de forces atome-unifié (UA) regroupent dans une seule particule chaque carbone aliphatique et les atomes d’hydrogène correspondants,
- les champs de forces gros-grain (CG) regroupent dans une seule particule plusieurs atomes lourds.

3.1.2 L’ALGORITHME DE DM

Le mouvement atomique est simulé par la résolution de l’équation du mouvement de Newton simultanément sur tous les atomes du système. Le principe de la DM est de calculer les forces agissant sur chaque atome puis d’évaluer sa nouvelle position sous l’effet de ces forces. La force \mathbf{F}_i agissant sur l’atome i à la position \mathbf{r}_i au temps t est donnée par le gradient de l’énergie potentielle (V) par rapport à la position \mathbf{r}_i de l’atome i :

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (3.1)$$

La nouvelle position de l’atome i sous l’effet de la force \mathbf{F}_i est obtenue en intégrant l’équation du mouvement de Newton :

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}, \quad (3.2)$$

où m_i est la masse de l’atome i et $\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2}$ (dérivée seconde de la position de l’atome i par rapport au temps) est l’accélération.

En répétant les équations 3.1 et 3.2, on obtient une trajectoire pour chaque atome au cours du temps.

Pour intégrer l'équation 3.2 plusieurs algorithmes ont été développés. Dans ce travail, nous avons utilisé l'algorithme « Leap-Frog » qui utilise les positions \mathbf{r}_i au temps t et les vitesses \mathbf{v}_i au temps $t - \frac{1}{2}\Delta t$ comme montré dans la Figure 3.2.

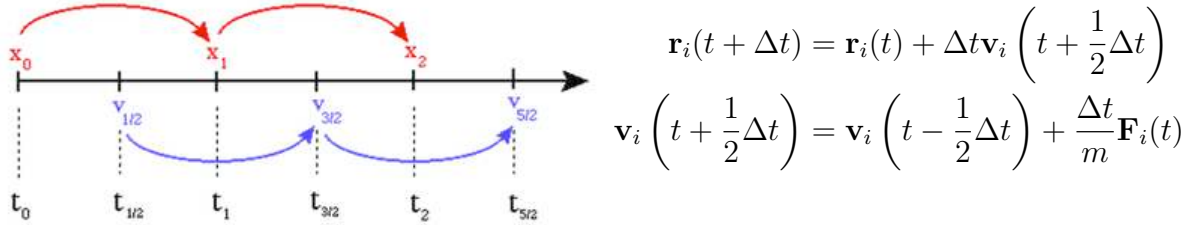


FIGURE 3.2 – Méthode d'intégration « Leap-Frog ». Tiré de einstein.drexel.edu.

Le pas pour intégrer l'équation du mouvement (Δt) (pas d'intégration) est choisi de manière à être d'un ordre de grandeur plus petit que les mouvements de plus haute fréquence du système (qui sont > 10 femtosecondes (fs) pour les vibrations de liaisons). En « gelant » les vibrations de liaisons, des pas d'intégration un peu plus importants (2 fs pour les simulations tout-atome (Hess, 2008; Ryckaert *et al.*, 1977)) peuvent être utilisés pour gagner en temps de calcul.

3.1.3 LES CONDITIONS PÉRIODIQUES

La boîte de simulation qui contient le système à simuler est de taille finie. Cela implique que les particules près des bords de la boîte n'ont pas les mêmes propriétés que les autres particules si : 1) l'interface de la boîte est au contact du vide, 2) les bords de la boîte sont rigides, 3) un champ de réaction est ajouté pour contrôler la diffusion des particules. Pour minimiser ces effets de bords, des conditions périodiques aux limites (PBC) (pour *Periodic Boundary Conditions*) sont appliquées sur la boîte de simulation. Les PBC consistent à répéter le système dans toutes les directions (x, y, z) afin que la boîte centrale soit entourée par ses copies périodiques. Ainsi, une particule qui sort d'un côté de la boîte centrale, réapparaît par le côté opposé (Figure 3.3).

Il est important de noter que les PBC induisent un ordre artificiel qui peut poser des problèmes pour reproduire certaines propriétés comme les ondulations d'une membrane. Pour contourner ce problème le système doit être très grand (plus de 1000 lipides) pour que chaque copie soit suffisamment grande pour onduler.

3.1.4 LE CONTRÔLE DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA PRESSION

La température et la pression sont les deux quantités typiquement contrôlées dans les expériences. Ainsi, il est naturel de contrôler ces quantités dans les simulations de DM.

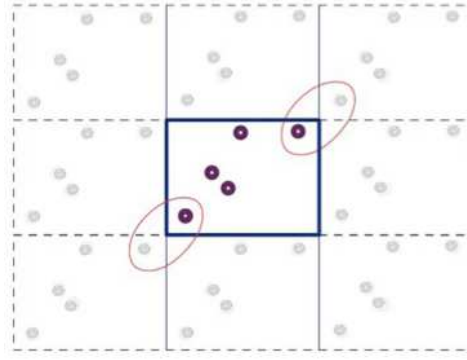


FIGURE 3.3 – Représentation des conditions périodiques.

Le système simulé correspond alors à un ensemble thermodynamique NPT (nombre de particules constant, pression constante et température constante).

LA TEMPÉRATURE

La température T est reliée à l'énergie cinétique du système et donc aux vitesses comme suit :

$$E_{cinetique} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 = \frac{1}{2} N_{df} kT \quad (3.3)$$

où m_i est la masse de l'atome i , v_i est la norme du vecteur vitesse \mathbf{v}_i de l'atome i , N_{df} est le nombre de degrés de liberté, k est la constante de Boltzmann et T la température.

Dans ce travail, nous avons utilisé les algorithmes de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) et Bussi (Bussi *et al.*, 2007) pour contrôler la température.

L'algorithme Berendsen (*weak coupling*) ajuste à chaque pas de temps les vitesses à un taux qui est proportionnel à la différence de température entre la référence (chaleur externe) et celle au temps t . L'algorithme Berendsen est très efficace pour atteindre très vite la température désirée mais il ne reproduit pas correctement les bonnes fluctuations de température (Hünenberger *et al.*, 1995). Cependant, si les propriétés d'intérêt auxquelles on s'intéresse ne dépendent pas de ces fluctuations ce n'est pas un obstacle.

L'algorithme de Bussi (*v-rescale*) contrôle la température en ajustant les vitesses avec un terme stochastique. Ce thermostat est similaire au couplage de Berendsen à ceci près que les auteurs ajoutent un terme stochastique qui assure qu'un ensemble canonique correct est généré.

Pour que le système soit à la température désirée en début de simulation, des vitesses initiales sont assignées sur chaque atome du système. Dans ce travail, ces vitesses initiales ont été générées aléatoirement selon une distribution de Maxwell-Boltzmann.

LA PRESSION

La pression est reliée au volume du système et aux interactions entre particules par l'équation :

$$\mathbf{P}V = \sum_{i=1}^N m_i \mathbf{v}_i \otimes \mathbf{v}_i + \sum_{i<j} \mathbf{r}_{ij} \otimes \mathbf{F}_{ij} \quad (3.4)$$

où le premier terme correspond à l'énergie cinétique, le second terme correspond au viriel (contribution due aux forces entre particules) et \mathbf{P} est la pression. Ces trois termes sont sous forme de tenseur.

La pression scalaire P , qui est utilisée pour le couplage est calculée comme suit :

$$P = \text{trace}(\mathbf{P}/3) \quad (3.5)$$

où la *trace* est la somme des termes diagonaux.

La pression du système peut être contrôlée en faisant varier le volume de la boîte de simulation et en ajustant la position des particules les unes par rapport aux autres. La taille de la boîte peut être ajustée de différentes manières : ajustement identique dans toutes les directions (couplage isotropique), ajustement identique seulement dans les directions x et y et indépendamment de la direction z (couplage semi-isotropique) ou ajustement indépendant dans toutes les directions (couplage anisotropique). Pour les simulations de membrane il est recommandé d'utiliser un couplage semi-isotropique à la pression pour que la membrane garde sa forme dans le plan xy .

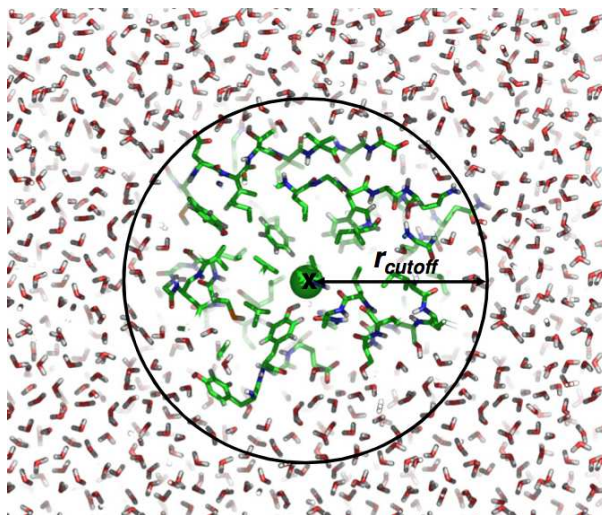
Dans ce travail nous avons utilisé les algorithmes de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) et Parrinello-Rahman (PR) (Parrinello et Rahman, 1981) pour contrôler la pression.

Le barostat Berendsen est très similaire au thermostat Berendsen mais en ajustant le volume plutôt que les vitesses par un terme qui proportionnel à la différence de pression.

Le barostat de PR utilise un système dit étendu. Dans une DM classique réalisée dans l'ensemble microcanonique NVE, l'Hamiltonien décrivant le système est constant : $H = K + V$, où K est l'énergie cinétique et V l'énergie potentielle du système. Dans le cas de PR l'Hamiltonien est étendu en lui ajoutant un terme de réservoir (de température ou de pression) et un terme de friction. L'avantage de PR par rapport à Berendsen est qu'il reproduit l'ensemble NPT, notamment les fluctuations de volumes. Pour beaucoup de propriétés mesurées en DM, on n'observe pas de différence entre l'utilisation de l'algorithme de Berendsen ou de PR, sauf quand lesdites propriétés dépendent des fluctuations de volumes qui ne sont pas reproduites correctement avec Berendsen.

TRAITEMENT DES INTERACTIONS LONGUES PORTÉES

Les interactions non-liées (entre particules non liées par une liaison covalente) représentent plus de 90 % du temps de calcul. Calculées sur toutes les paires de particules du système, elles sont proportionnelles à N^2 où N correspond au nombre de particules. Cependant, les interactions non-liées diminuent rapidement avec la distance : en $\frac{1}{r^6}$ pour la fonction Lennard-Jones et en $\frac{1}{r}$ pour l'interaction Coulomb (voir Équation 1). Ainsi, si la distance r entre deux particules est grande, les interactions van der Waals et électrostatique entre ces deux atomes seront faibles, voire proches de 0. La méthode du *cutoff* consiste à calculer seulement les interactions non-liées entre les particules proches, c'est-à-dire distantes de moins d'un *cutoff* donné (Figure 3.4).

FIGURE 3.4 – Méthode du *cutoff*.

Toutefois, la troncation des interactions électrostatiques mène à de nombreux artefacts car elle provoque une discontinuité dans le potentiel et donc sur l'énergie et sa dérivée (force). Pour contourner ce problème, nous avons utilisé la méthode *Particle Mesh Ewald* (PME) (Darden *et al.*, 1993) qui suppose le système périodique dans toutes les directions (jusqu'à l'infini dans un cristal). Dans le système, toutes les interactions répliquées périodiquement sont sommées (interpolation de la sommation Ewald dans l'espace réciproque), et donc toutes les interactions longue portée sont prises en compte. La méthode PME ne tronque pas les interactions électrostatiques mais calcule différemment les interactions à l'intérieur et à l'extérieur d'un pseudo cutoff. Les interactions à l'intérieur du pseudo *cutoff* sont calculées dans l'espace réel tandis que celles en-dehors sont calculées dans l'espace réciproque via une transformée de Fourier. De plus, la liste des « voisins » de chaque particule n'est pas mise à jour tous les pas mais tous les n pas.

3.2 LE REMD

Le repliement d'un peptide à la surface d'une membrane par simulations DM relève du défi car il nécessite de très longues simulations (allant de microseconde à la milliseconde).

Pour contourner ce problème, nous avons réalisé une simulation de REMD (Hukushima et Nemoto, 1996; Sugita et Okamoto, 1999) qui consiste à simuler plusieurs répliques du système à différentes températures et à échanger l'état complet de deux répliques voisines à des intervalles réguliers (Figure 3.5) avec la probabilité :

$$P(1 \leftrightarrow 2) = \min \left(1, \exp \left[\left(\frac{1}{k_B T_1} - \frac{1}{k_B T_2} \right) (U_1 - U_2) \right] \right)$$

où T_1 et T_2 sont les températures des répliques 1 et 2, U_1 et U_2 sont respectivement les énergies potentielles des répliques 1 et 2 et k_B est la constante de Boltzmann.

Après un échange, les vitesses sont ajustées par $(T_1/T_2)^{\pm 0,5}$ et une recherche voisine est effectuée au pas suivant. Cette méthode combine un échantillonnage rapide et un passage fréquent des barrières à la plus haute température avec un échantillonnage correct de Boltzmann à toutes les différentes températures.

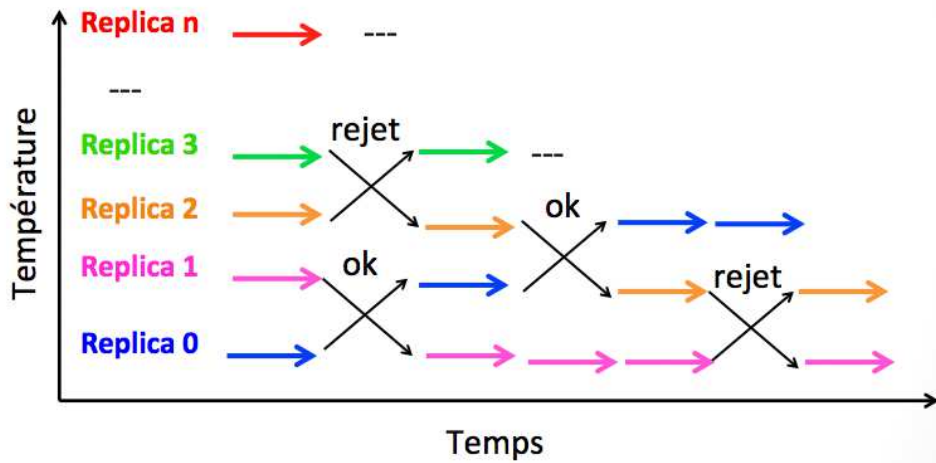


FIGURE 3.5 – Représentation schématique du REMD dans lequel les répliques du même système évoluent dans le temps et dans les températures.

3.3 PARAMÈTRES ET PROTOCOLES DES SIMULATIONS DE DM UTILISÉS DANS CE TRAVAIL

3.3.1 LES LIPIDES UTILISÉS

Pour construire des bicouches lipidiques présentant un *packing* de plus en plus lâche entre les têtes polaires des lipides, nous avons donc utilisé les lipides du Tableau 3.2,

lipides qui présentent des insaturations de plus en plus nombreuses (de 0 à 2) et de formes cylindrique et conique.

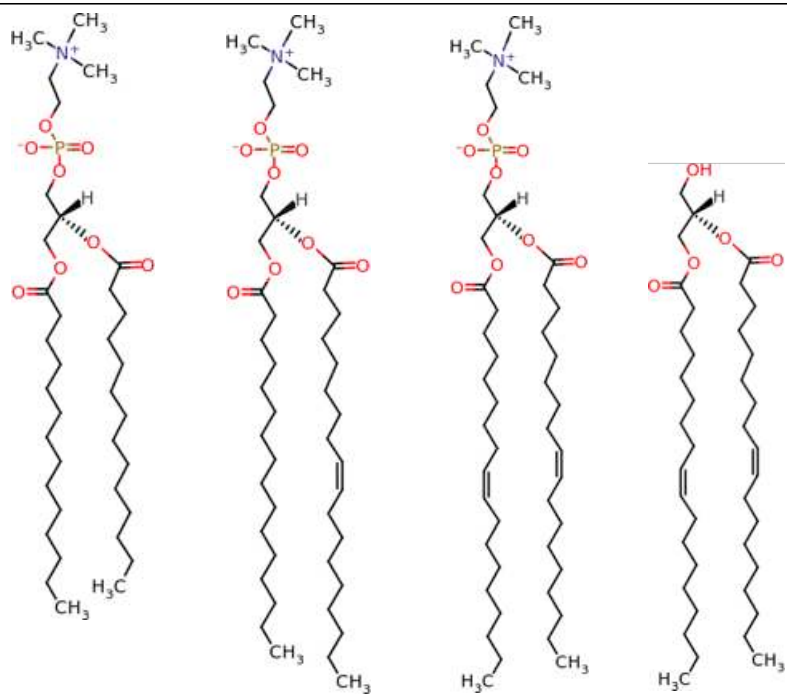
Nom	DMPC	POPC	DOPC	DOG
T _m (°C)	23	-2	-20	-
Aire/lipide (nm ²)	0,61 ^a et 0,60 ^b	0,68 ^c et 0,64 ^b	0,72 ^d	-
Structure				

Tableau 3.2 – Lipides utilisés dans ce travail. T_m est la température de transition de phase et aire/lipide est l’aire occupée par un lipide. a : (Kucerka *et al.*, 2005a), b : (Kucerka *et al.*, 2011), c : (Kucerka *et al.*, 2005b), d : (Tristram-Nagle *et al.*, 1998). Les mesures expérimentales sont montrées dans le Tableau 1 en appendice.

Le DMPC est le lipide le plus ordonné car il ne contient pas d’insaturation dans ses chaînes aliphatiques. Le POPC est plus ordonné que le DOPC car il contient une insaturation dans une des chaînes contre deux (une par chaîne) pour le DOPC.

Le DOG quant à lui ne forme pas spontanément de bicouche en raison de sa forme conique. Cependant à une concentration maximale de 15% dans une bicouche de DOPC, cette dernière reste lamellaire (Das et Rand, 1986; Oradd *et al.*, 1995) mais avec encore plus de défauts que dans une bicouche pure de DOPC.

Dans ce travail, les lipides ont été décrits avec le champ de forces Berger (Berger *et al.*, 1997) qui a été modifié pour qu’il soit compatible avec le champ de forces OPLS-AA qui est utilisé pour décrire le peptide et nous avons utilisé la topologie DOG décrite dans Gonzalez-Rubio *et al.* (2011).

Pour les lipides DOPC et DOG nous avons corrigé la double liaison en conformation *cis* de chaque chaîne comme suggéré par des études antérieures (Bachar *et al.*, 2004; Martinez-Seara *et al.*, 2008).

Finalement, pour être compatible avec le champ de force Berger pour les lipides et le champ de forces OPLS-AA (Jorgensen, 1986) pour le peptide, les molécules d'eau ont été décrites avec le modèle TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983).

3.3.2 LES PEPTIDES UTILISÉS

Dans ce travail, nous avons étudié deux séquences du motif ALPS issu de la protéine ArfGAP1 (voir partie 2.5.1) : ALPS-35 et ALPS-23. Ces deux peptides sont amphipathiques avec une face polaire riche en résidus sérine (S) et thréonine (T) et une face apolaire riche en gros résidus hydrophobes tels que phénylalanine (F), leucine (L), méthionine (M) et tryptophane (W) comme illustré dans la Figure 3.6.

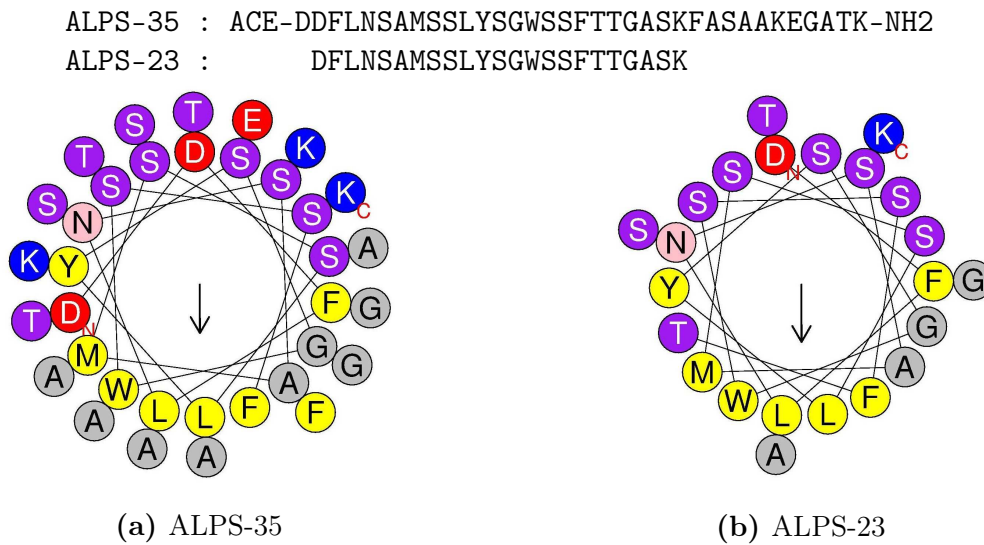


FIGURE 3.6 – Représentation en roue hélicoïdale des peptides ALPS-35 et ALPS-23. Les gros résidus hydrophobes sont montrés en jaune et les résidus polaires sont montrés en violet. Le flèche indique le moment hydrophobe qui est de 0,365 pour ALPS-35 et 0,434 pour ALPS-23.

Le peptide ALPS-35 contient 35 résidus et nous lui avons ajouté des extrémités non chargées comme dans les travaux de Gonzalez-Rubio *et al.* (2011). Le peptide ALPS-23 contient 23 résidus correspondant à la partie N-ter du peptide ALPS-35 et représente la séquence minimale du motif ALPS. Comparé au peptide ALPS-35, les extrémités du peptide ALPS-23 sont laissées chargées afin d'augmenter sa solubilité en solution.

3.3.3 PARAMÈTRES DES SIMULATIONS

Toutes les simulations ont été réalisées avec le programme GROMACS version 4.5.3 (Hess *et al.*, 2008) dans un ensemble NPT (nombre de particules, température et pression constantes) avec des conditions périodiques appliquées dans toutes les directions (x, y, z) afin de s’affranchir des effets de bords.

Les algorithmes que nous avons utilisés dans ce travail sont listés avec leurs paramètres dans le Tableau 3.3.

Étape	Algorithme	Paramètres
Minimisation	<i>Steepest-descent</i>	100 pas
Équilibration	Berendsen	300 K avec une constante de temps de 0,1 ps
	Berendsen	1 bar avec une constante de temps de 1 ps et une compressibilité de $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$
Production	Bussi	300 K avec une constante de temps de 0,1 ps
	Parrinello-	1 bar avec une constante de temps de 4 ps
	Rahman	et une compressibilité de $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$

Tableau 3.3 – Paramètres des simulations.

Au cours de la phase d’équilibration, les trajectoires ont été initialisées en assignant, à 300 K, des vitesses dans la distribution de *Maxwell-Boltzmann*.

À la fois pendant la phase d’équilibration et la phase de production, un couplage sur la pression a été appliqué de manière semi-isotropique, c’est à dire que les directions x et y sont couplées indépendamment de la direction z .

Pour utiliser un pas d’intégration de 2 fs (voir partie 3.1.2), les longueurs des liaisons ont été contraintes par l’algorithme *Linear Constraint Solver* (LINCS) et les longueurs des liaisons des molécules d’eau ont été maintenues rigides en utilisant l’algorithme SETTLE (Miyamoto et Kollman, 1992).

3.4 MÉTHODES D’ANALYSE DES TRAJECTOIRES UTILISÉES DANS CE TRAVAIL.

3.4.1 MÉTHODES D’ANALYSE DES PROPRIÉTÉS DES MEMBRANES.

Nous avons utilisé des systèmes de différentes tailles et nous les avons simulés sur des temps variables en fonction des propriétés analysées comme montré dans le Tableau 3.4.

Ce choix est motivé par le meilleur compromis entre la convergence de la propriété mesurée et le coût en temps de calcul. L’erreur de mesure a été évaluée en divisant

la trajectoire en plusieurs blocs et en calculant l'écart-type des moyennes calculées sur chaque bloc.

Système	Nb lipides	Temps (ns)	Nb blocs	Type d'analyse
DOPC DOPC/DOG	70	100-200	1	Aire/lipide Volume/lipide
DOPC DOPC/DOG	70	100-200	3	Épaisseur hydrophobe
DOPC DOPC/DOG	128	100-300	1	Densité Distribution radiale
DOPC DOPC/DOG	128	100-300	1	Paramètre d'ordre
DOPC DOPC/DOG	128	100-300	2	Diffusion latérale
DOPC DOPC/DOG	128	0-120	1	<i>Potential of Mean Force</i> (PMF)
DOPC DOPC/DOG	70	100-800	3	Module de compressibilité
DOPC DOPC/DOG	1024	5-200	3	Module de rigidité
DOPC DOPC/DOG	128	100-300	3	Profil de pression latérale

Tableau 3.4 – Aperçu des différentes simulations et types d'analyse.

AIRE ET VOLUME PAR LIPIDE

L'aire par lipide et le volume par lipide sont deux paramètres importants fréquemment utilisés pour caractériser les bicouches et surveiller les transitions de phase. En effet, une diminution de ces deux paramètres traduit une augmentation de l'ordre des lipides et donc le passage dans une phase plus rigide (phase gel).

Dans ce travail, l'aire par lipide et le volume par lipide ont été déterminés de deux manières : l'une pour les bicouches composées d'un seul type de lipide (bicouches pures) et l'autre pour les bicouches composées de deux types de lipides (bicouches mixtes).

Pour les bicouches pures, l'aire moyenne par lipide a été obtenue en divisant l'aire totale de la boîte de simulation par le nombre de lipides dans un feuillet et le volume moyen par lipide a été obtenu en divisant le volume de la bicouche ($V_{\text{système total}} - V_{\text{eau}}$)

par le nombre total de lipides.

Pour les bicouches mixtes (ici DOPC/DOG), nous avons utilisé l'approche proposée par Edholm et Nagle (2005) qui consiste à simuler plusieurs bicouches en faisant varier la concentration de l'un des deux lipides (ici le DOG).

Ensuite, à partir de l'aire totale par lipide $A_L(x)$ estimée pour chaque composition, on peut extraire l'aire par DOPC et l'aire par DOG à partir de l'équation suivante :

$$\frac{A_L(x)}{1-x} = A_{DOPC}(x) + \frac{x}{1-x} A_{DOG}(x),$$

où x est la fraction molaire en DOG, $A_L(x)$ est l'aire totale par lipide, $A_{DOPC}(x)$ est l'aire par DOPC et $A_{DOG}(x)$ est l'aire par DOG.

Ainsi, $A_{DOPC}(x)$ et $A_{DOG}(x)$ correspondent respectivement à l'ordonnée à l'origine et à la pente de la droite (Figure 3.7).

À partir du volume total par lipide $V_L(x)$ estimé pour chaque bicouche, on peut extraire le volume par DOPC et le volume par DOG à partir de l'équation suivante :

$$V_L(x) = (1-x) V_{DOPC}(x) + x V_{DOG}(x)$$

où x est la fraction molaire en DOG, $V_L(x)$ est le volume total par lipide, $V_{DOPC}(x)$ est le volume par DOPC et $V_{DOG}(x)$ est le volume par DOG.

Ainsi, $V_{DOPC}(x)$ et $V_{DOG}(x)$ correspondent respectivement à $V_L(x)$ quand $x=0$ et $V_L(x)$ quand $x=1$ (Figure 3.8).

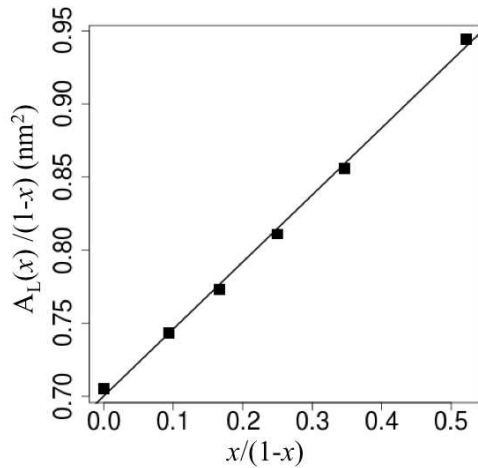


FIGURE 3.7 – Évaluation de l'aire par DOPC et de l'aire par DOG en faisant varier la concentration en DOG (x).

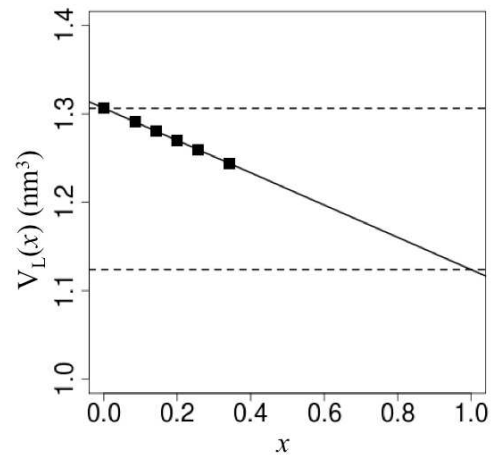


FIGURE 3.8 – Évaluation du volume par DOPC et du volume par DOG en faisant varier la concentration en DOG (x).

ÉPAISSEUR HYDROPHOBE DE LA BICOUCHE

L'épaisseur hydrophobe a été évaluée à partir de la distance pic à pic de la densité massique (masse par unité de volume) du premier carbone aliphatique (atome C2) des lipides (DOPC et DOG) comme illustré dans la Figure 3.9.

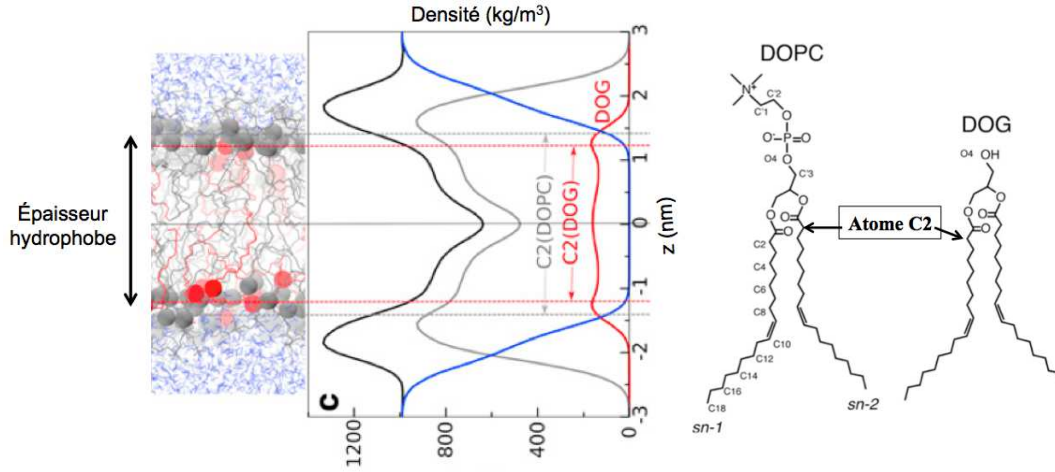


FIGURE 3.9 – Estimation de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche à partir de la densité des premiers carbones aliphatiques (atomes C2). À gauche : la densité des atomes C2 est représentée par les lignes en pointillés (grise pour le DOPC et rouge pour le DOG) et à droite : localisation des atomes C2 dans les lipides DOPC et DOG.

DISTRIBUTION RADIALE

La distribution radiale permet d'étudier la structure d'un système composé de particules (atomes ou molécules) en mesurant la probabilité $g(r)$ de trouver une particule j à une distance r d'une particule de référence (Figure 3.10) comme suit :

$$g(r) = \frac{\rho(r)}{\rho} = \frac{N(r)}{4\pi r^2 \rho dr}$$

où $\rho(r)$ et ρ sont respectivement les densités atomiques dans la couche sphérique (située à une distance r de l'atome de référence) et dans la boîte de simulation, $N(r)$ est le nombre d'atomes dont le centre est dans la couche sphérique et dr est l'épaisseur de la couche sphérique.

Un exemple de distribution radiale dans un fluide de Lennard-Jones mono-atomique est donné dans la Figure 3.11.

Dans ce travail nous avons analysé deux fonctions de distribution radiale. La première entre l'atome d'oxygène de l'eau et l'atome d'oxygène porté par le phosphate des DOPC (atome O4) et la deuxième entre l'atome d'oxygène de l'eau et l'atome d'oxygène porté

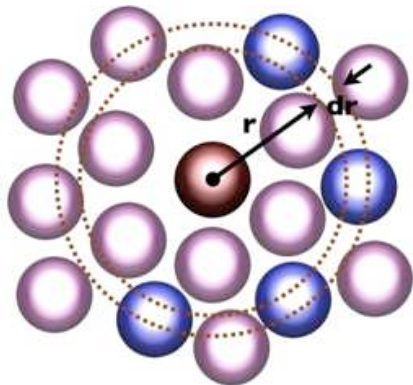


FIGURE 3.10 – Illustration du calcul de $g(r)$. La particule de référence est représentée en rouge et les particules localisées dans la couche d'épaisseur dr sont représentées en bleu.

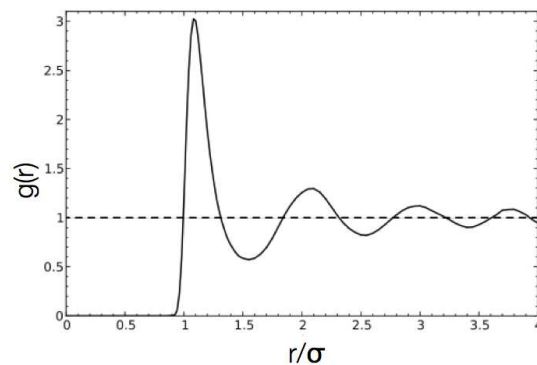


FIGURE 3.11 – Fonction de la distribution radiale $g(r)$ pour un fluide de Lennard-Jones. Le premier puits (~ 1.5 nm) correspond à la première couche d'hydratation, le deuxième puits (~ 2.5 nm) correspond à la deuxième couche et le troisième puits (~ 3.5 nm) correspond à la troisième couche.

par l'hydroxyle des DOG (atome O4). Une structure de ces deux lipides est montrée dans la Figure 3.9.

PARAMÈTRE D'ORDRE DES LIPIDES

Pour évaluer l'orientation moyenne des lipides par rapport à la normale à la membrane, nous avons évalué le paramètre d'ordre des lipides. Ce paramètre est mesuré expérimentalement par des expériences de RMN au deutérium. Il exprime la mobilité des liaisons carbone-deutérium.

Le signal de RMN mesure l'angle formé par le champ magnétique (parallèle à la normale à la membrane \mathbf{z}) et la liaison carbone-deutérium. Toutefois, Douliez *et al.* (1998) ont montré que cet angle peut être approximé par l'angle formé par la normale à la membrane \mathbf{z} et l'axe du vecteur passant par le carbone $i - 1$ et le carbone $i + 1$ comme illustré dans la Figure 3.12. Ainsi, nous avons :

Le paramètre d'ordre peut varier de 1 (quand le vecteur passant par le carbone $i - 1$ et le carbone $i + 1$ est parallèle à la normale à la membrane et statique) à 0 (quand le vecteur correspond à une orientation isotrope et donc mobile). Ainsi, plus le paramètre d'ordre est proche de 1, plus les lipides sont ordonnés parallèlement à la normale à la membrane.

Pour cette analyse, nous avons utilisé la version 4.5.4 de GROMACS dans laquelle une correction a été ajoutée pour estimer correctement le paramètre d'ordre du premier carbone de la double liaison.

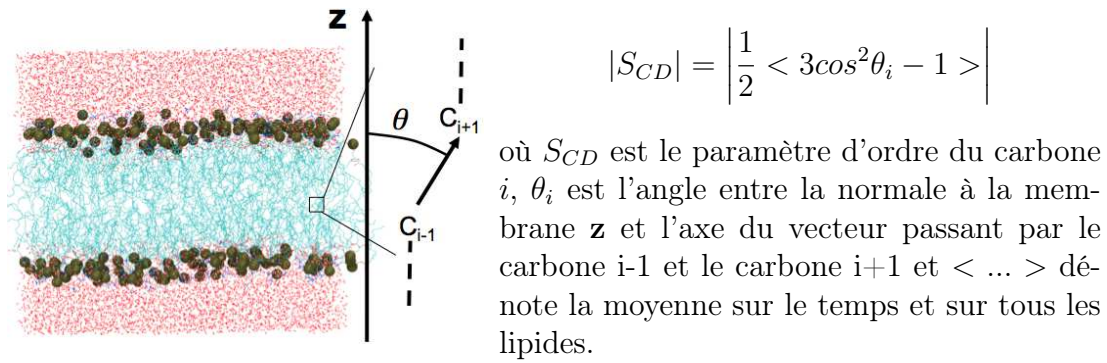


FIGURE 3.12 – Estimation du paramètre d'ordre des lipides.

DIFFUSION LATÉRALE DES LIPIDES

La diffusion latérale des lipides est une propriété dynamique décrivant la capacité des lipides à se déplacer latéralement dans la bicouche. Elle est obtenue à partir de la pente D du *Mean Squared Displacement* (MSD) grâce à la relation d'Einstein à deux dimensions :

$$D = \frac{1}{2d} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle [r(t_0 + t) - r(t_0)]^2 \rangle}{t}$$

où d est la dimension ($= 2$ pour la constante de diffusion latérale à deux-dimensions), $\mathbf{r}(t_0)$ est la position d'un lipide (ici représenté par l'atome de phosphate pour le DOPC et l'atome d'oxygène de l'hydroxyle pour le DOG) au temps t_0 , $r(t_0 + t)$ est la position du lipide après un certain temps t (pour augmenter la statistique, on décale l'origine des temps) et $\langle \dots \rangle$ dénote la moyenne sur tous les lipides d'un feuillet.

Le coefficient de diffusion a été calculé séparément dans chaque feuillet pour supprimer le mouvement artificiel inter-feuillet comme suggéré dans Wohlert et Edholm (2006).

POTENTIEL DE FORCE MOYENNE

Le PMF d'une molécule à travers la bicouche correspond à la variation d'énergie libre le long d'une coordonnée réactionnelle, par exemple le long de la normale à la membrane.

Le PMF $W(z)$ le long de l'axe z (normale au plan de la membrane) est relié à la fonction de distribution moyenne $\langle \rho(z) \rangle$ comme suit :

$$W(z) = W(z_0) - k_b T \ln \left[\frac{\langle \rho(z) \rangle}{\langle \rho(z_0) \rangle} \right] \quad (3.6)$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T la température, z_0 est le point de référence dans le *bulk*.

Toutefois, comme l'échantillonnage est limité par le temps de calcul disponible, l'équation 3.6 ne peut pas être utilisée de manière directe pour obtenir le PMF. Pour contourner

ce problème on utilise la méthode *d'umbrella sampling* (Torrie et Valleau, 1977). Cette méthode consiste à définir une fenêtre en z_i (pour i variant de 1 à n) et à introduire des potentiels harmoniques biaisés $w_i(z)$ sur la molécule pour la contraindre au voisinage de z_i et donc augmenter son échantillonnage en (x, y) dans la fenêtre où on a :

$$w_i(z) = \frac{1}{2}K(z - z_i)^2 \quad (3.7)$$

où K est une constante de forces.

Pour chaque w_i (potentiel fenêtre), une simulation de MD est lancée pour obtenir la distribution biaisée de la molécule. Ces distributions sont alors dé-biaisées et combinées pour donner un PMF avec la méthode *Weighted Histogram Analysis Method* (WHAM) (Kumar *et al.*, 1992).

Dans ce travail, nous avons appliqué un potentiel harmonique sur l'oxygène de l'hydroxyle du DOG (ou le phosphate du DOPC) par rapport au centre de masse de la bicouche, avec une constante de forces K de $3000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$. Pour les PMF du DOPC et du DOG, 21 simulations indépendantes avec un espace entre chaque fenêtre de 0,1 nm (de 0 nm à 2 nm) ont été lancées sur 120 ns (deux de 60 ns pour chacune des 21 fenêtres). Les conformations de départ des deux ensembles de simulation ont été obtenues en tirant soit le DOG soit le DOPC dans les deux directions. Ainsi, nous avons obtenu un PMF pour chaque feuillet et l'erreur a été estimée comme l'écart-type sur les deux jeux de simulation.

COMPRESSIBILITÉ DE LA BICOUCHE

Le module de compressibilité K_A peut être évalué à partir des fluctuations de l'aire de la bicouche comme suit :

$$K_A = \frac{Ak_bT}{\sigma_A^2}$$

où A est l'aire totale de la bicouche, k_b la constante de Boltzmann, T la température et σ_A^2 la variance de A .

Pour éviter les problèmes liés aux ondulations, nous avons utilisé des petits patches de 70 lipides (presque sans ondulation) mais en poussant les simulations sur des temps très longs (Tableau 3.4) pour évaluer l'erreur de mesure. Il a été montré que la compressibilité calculée sur des petits patches surestime la valeur de K_A (Waheed et Edholm, 2009) tandis que sur des grands patches les ondulations doivent être retirées des fluctuations de l'aire pure (Waheed et Edholm, 2009).

Néanmoins, nous nous intéressons seulement à la comparaison des systèmes entre eux plutôt qu'à la reproduction des valeurs expérimentales.

RIGIDITÉ DE LA BICOUCHE

La rigidité de la bicouche a été évaluée à partir des ondulations issues de très grand patches (> 1000 lipides) (voir Tableau 3.4).

En utilisant le modèle continu d'Helfrich, il est possible d'extraire le module de rigidité κ à partir du spectre de puissance (voir Brandt *et al.* (2011) et Lindahl et Edholm (2000)) comme suit :

$$\langle |U(q)|^2 \rangle = k_b T / A \kappa q^4 \quad (3.8)$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T est la température, A est l'aire totale de la bicouche, $U(q)$ est la transformée de Fourier discrète du déplacement $u(\mathbf{r})$ en dehors du plan de la bicouche dans la représentation de Monge ($\mathbf{r} = [r_x, r_y]$), et $\langle \dots \rangle$ dénote la moyenne sur toute la trajectoire (noter que le terme en q^{-2} impliquant la tension de surface microscopique γ a été omis puisque nous nous intéressons seulement au régime des ondulations).

Pour obtenir κ à partir de l'équation 3.8, nous avons tout d'abord évalué $U(q)$. Pour ce faire, nous avons discrétisé la bicouche carrée de longueur L dans une grille $N \times N$ dont chaque élément est de taille $l = L/(N - 1)$. L'atome de phosphate du feuillet du haut avec les plus petites coordonnées $[x, y]$ a été arbitrairement choisi comme origine (*i.e.* \mathbf{r}_1). Pour chaque point de la grille k et pour chaque feuillet, nous avons calculé $z(\mathbf{r}_k)$ comme la moyenne de la coordonnée z de trois atomes de phosphate les plus proches. Le déplacement en dehors du plan a été calculé à partir des positions z moyennes entre les deux feuillets : $u(\mathbf{r}_k) = \frac{1}{2} [z_{haut}(\mathbf{r}_k) + z_{bas}(\mathbf{r}_k)]$.

Ensuite, $U(q)$ a été évalué à partir de $u(\mathbf{r}_k)$ en utilisant la transformée de Fourier :

$$U(\mathbf{q}) = \frac{1}{N^2} \sum_{k=1}^{N^2} u(\mathbf{r}_k) e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_k} \quad (3.9)$$

où \mathbf{q} est le vecteur d'onde 2D, *i.e.* $\mathbf{q} = [q_x, q_y] = 2\pi [n_x, n_y] / L$ (n_x et n_y sont des entiers allant de 0 à $N - 1$). Finalement, $U(\mathbf{q})$ a été converti en $U(q)$, où q est la norme de \mathbf{q} .

Dans la représentation graphique en log-log et dans la zone où $|U(q)|^2$ se comporte en q^{-4} , le module de rigidité κ est la valeur obtenue pour $q = 0,3$ comme illustré dans la Figure 3.13.

PROFIL DE PRESSION LATÉRALE

Une bicouche lipidique a une petite épaisseur ($\sim nm$) par rapport à sa taille latérale ($\sim \mu m$). L'énergie à l'interface polaire-apolaire sur une petite épaisseur donne lieu à une pression locale d'amplitude élevée. La distribution de la pression locale (à partir des têtes

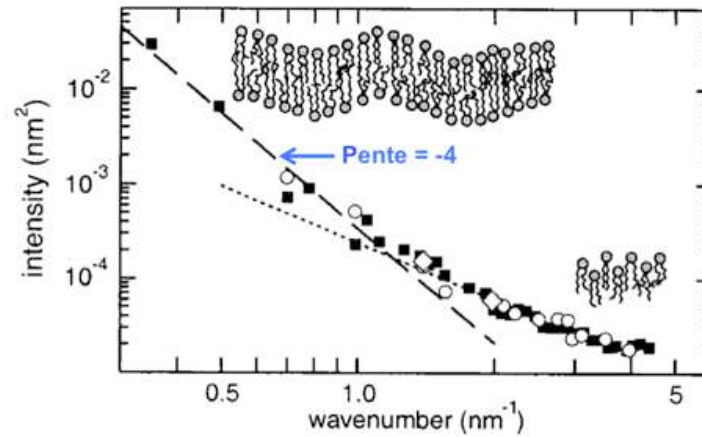


FIGURE 3.13 – Représentation de $|U(q)|^2$ en fonction de q en échelle log-log pour trois tailles de systèmes : petit (losanges), moyen (cercles) et grand (carrés). La droite en tirets représente le régime des ondulations déterminé par le module de rigidité tandis que la droite en pointillés décrit la tension de surface microscopique γ . Tiré de Lindahl et Edholm (2000).

polaires jusqu’aux chaînes) le long de la normale à la membrane peut-être caractérisée par le profil de pression latérale π (aussi connue sous le nom de stress latéral) comme illustré dans Figure 3.14.

La pression latérale est négative au niveau de l’interface polaire-apolaire entre les têtes polaires et les chaînes aliphatiques (en raison de la tension interfaciale) et elle est positive au niveau des chaînes aliphatiques et au niveau des têtes polaires (en raison des répulsions entre les chaînes aliphatiques et entre les têtes polaires respectivement). Lorsque la bicouche est à l’équilibre, la pression latérale globale (*i.e* l’intégrale du profil de pression latérale le long de la normale) est égale à 0, ce qui correspond à un parfait équilibre entre les contributions négatives et positives.

Le profil de pression latérale est obtenu en découpant la boîte de simulation en tranches de 0,1 nm le long de la normale \mathbf{z} et la pression locale est calculée pour chaque tranche à partir du viriel local comme décrit dans Ollila *et al.* (2007a, 2009).

Alors le profil de pression latérale est évalué comme suit :

$$\pi(z) = P_L - P_N$$

où P_L est la composante latérale (dans le plan xy , $P_L = (P_{xx} + P_{yy})/2$) du tenseur de pression et P_N est la composante normale (le long de \mathbf{z} , $P_N = P_{zz}$).

Bien que la composante P_N devrait être constante pour satisfaire la stabilité mécanique dans une bicouche plate homogène, Ollila a noté récemment que les simulations tout-atome fournissent un P_N non-constant au contraire des simulations gros-grain pour lesquelles l’échantillonnage est beaucoup plus important (Waheed et Edholm, 2009). Se-

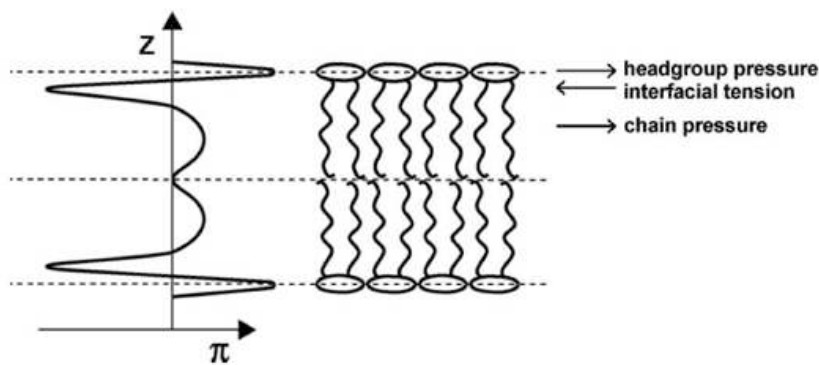


FIGURE 3.14 – Représentation schématique du profil de pression latérale dans une bicouche. La pression latérale (π) est indiquée comme une fonction de la profondeur (z) dans la bicouche. Une pression négative due à la tension à l'interface polaire-apolaire est compensée par une pression latérale positive au niveau des têtes polaires et des chaînes aliphatiques (en raison de la répulsion). Tiré de van den Brink-van der Laan *et al.* (2004).

lon cet auteur, une explication possible pourrait être due aux contraintes appliquées sur les longueurs de liaison dans les simulations tout-atome.

Dans nos simulations, P_N n'est pas constant le long de z mais son profil est similaire dans toutes les simulations. Comme nous sommes seulement intéressés par le comportement relatif entre les différents systèmes, nous avons reporté seulement la composante P_L dans les profils de pression latérale que nous appelons $P(z)$ comme dans Ollila *et al.* (2007a, 2009).

Dans ce travail nous avons utilisé la version 4.0.2 modifiée de GROMACS pour calculer les profils de pression latérale.

3.4.2 MÉTHODE D'ANALYSE DES PROPRIÉTÉS DU PEPTIDE

DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE

Pour estimer la structure secondaire du motif ALPS, nous avons utilisé deux méthodes : *Define Secondary Structures of Proteins* (DSSP) et *Protein Blocks*, blocs protéiques (PB).

Le programme DSSP (Kabsch et Sander, 1983) détermine la structure secondaire à partir de la position des atomes puis calcule l'énergie des liaisons hydrogènes entre tous les atomes. Les deux meilleures liaisons hydrogènes pour chaque atome sont alors utilisées pour déterminer la classe de structure secondaire la plus probable de chaque atome.

Huit types de structures secondaires sont définis par l'algorithme DSSP :

- l'hélice 3_{10} dans laquelle le carbonyle -CO du résidu i forme une liaison hydrogène avec l'amide du résidu $i+3$,
- l'hélice α dans laquelle le carbonyle -CO du résidu i forme une liaison hydrogène

- avec l'amide du résidu $i+4$,
- l'hélice π dans laquelle le carbonyl -CO du résidu i forme une liaison hydrogène avec l'amide du résidu $i+5$,
- le coude β dans lequel le carbonyl -CO du résidu i forme une liaison hydrogène avec l'amide du résidu $i+3$, $i+4$ ou $i+5$,
- le brin β étendu au sein d'un feuillet parallèle ou antiparallèle (longueur minimale, 2 résidus)
- le pont isolé (*single bridge*)
- la rotation locale au niveau du résidu i (*bend*)
- le *coil* correspondant à toute structure secondaire différente de celles citées ci-dessus.

Les PB (Joseph *et al.*, 2010) sont un alphabet structural composés de 16 prototypes locaux. Chaque bloc est caractérisé par les angles dièdres ϕ , ψ de cinq résidus consécutifs. Obtenus à travers une approche d'apprentissage non supervisée sur une base de données représentatives non redondantes, les PB fournissent une raisonnable approximation des structures (3D) locales des protéines (De Brevern *et al.*, 2000). Les PB sont nommés de a à p : les PB m et d décrivent respectivement le centre de l'hélice- α et le centre du brin- β . Les PB de a à c représentent principalement les premiers résidus du brin- β et les PB e et f , les derniers résidus du brin- β ; les PBs de g à j pour le *coil*, les PB k et l pour les premiers résidus de l'hélice- α , et les PB de n à p pour les derniers résidus de l'hélice- α .

RAYON DE GIRATION

Le rayon de giration décrit la compacité de la molécule et est calculé comme étant la moyenne quadratique des distances des atomes lourds au centre de masse :

$$R_{gyr} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{CM}|^2}$$

où N est le nombre d'atomes, les vecteurs \mathbf{r}_i et \mathbf{r}_{CM} sont respectivement la position de l'atome i et la position du centre de masse.

RMSD

Le *Root Mean Square Deviation*, écart quadratique moyen (RMSD) permet d'évaluer la différence géométrique entre deux conformations différentes (d'une même molécule ou d'un même système moléculaire) après un alignement. Le RMSD est calculé comme suit :

$$RMSD(a, b) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N | \mathbf{r}_i(a) - \mathbf{r}_i(b) |^2}$$

où N est le nombre d'atomes, a et b sont les deux conformations, les vecteurs $\mathbf{r}_i(a)$ et $\mathbf{r}_i(b)$ sont respectivement la position de l'atome i dans la conformation a et la position de l'atome i dans la conformation b .

3.5 EXPÉRIENCES *in vitro*

Parallèlement aux simulations de DM, j'ai réalisé avec Guillaume Drin, de l'équipe de Bruno Antonny à Nice, des expériences *in vitro* telles que la préparation de liposomes, la détermination de la taille des liposomes et la spectroscopie de dichroïsme circulaire de peptides.

3.5.1 PRÉPARATION DES LIPOSOMES

Les lipides utilisés pour préparer les liposomes ont été synthétisés par *Avanti Polar lipids* et nous ont été livrés sous forme soluble dans du chloroforme. La première étape de la préparation des liposomes consiste à obtenir un film lipidique fin et sec. Pour ce faire, la quantité de lipides souhaitée est introduite dans une petite fiole en forme de poire qui est ensuite mise en rotation à l'aide d'un rotovapeur jusqu'à disparition complète du solvant (durée ~ 1 h). Le film lipidique sec est ensuite repris dans du tampon Tris 10 mM pH 7.2, 120 mM de NaCl. Puis, pour décoller le film lipidique qui adhère à la fiole, on ajoute quelques billes de verre et on agite pendant une minute. À l'issue de cette étape on obtient une suspension de liposomes multilamellaires, *Multilamellar Vesicles* (MLV), hététogènes en taille. Alors, les MLV sont prêts à être extrudés pour donner naissance à des gros liposomes unilamellaires, LUV, ou soniqués pour produire des petits liposomes unilamellaires, *Small Unilamellar Vesicles* (SUV), comme représenté dans la Figure 3.15.

EXTRUSION DES LIPOSOMES

Avant de procéder à l'extrusion des liposomes, la suspension de MLV subit cinq cycles de congélation (dans l'azote liquide) et décongélation (dans un bain à 40 °C) afin de réduire le nombre de lamelles des MLV. Après cette première fragmentation, les liposomes peuvent être immédiatement extrudés ou stockés à -20 °C pour être utilisés plus tard. L'extrusion consiste à fragmenter les MLV de la suspension en liposomes plus petits et plus unilamellaires. À cet effet, on utilise un extrudeur manuel qui permet d'appliquer

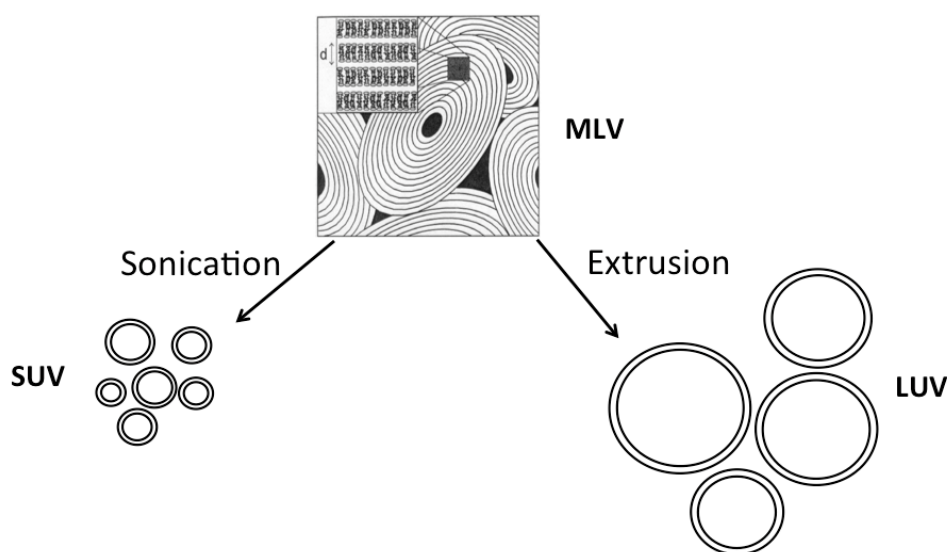


FIGURE 3.15 – Représentation d'un liposome multilamellaire (MLV), de petits liposomes unilamellaires (SUV) et de gros liposomes unilamellaires (LUV). L'image des MLV est tirée de Nagle et Tristram-Nagle (2000).

une pression mécanique sur la suspension pour forcer son passage à travers un filtre de polycarbonate dont la taille des pores est calibrée.



FIGURE 3.16 – Image d'un extrudeur. Le filtre de polycarbonate est placé entre les deux seringues.

Après vingt et un passages à travers le filtre de polycarbonate, les liposomes sélectionnés sont de taille homogène avec un diamètre correspondant à celui des pores du filtre. Dans ce travail nous avons utilisé trois tailles de pore ($0.2 \mu\text{m}$, $0.1 \mu\text{m}$ et $0.05 \mu\text{m}$) pour préparer trois tailles de liposomes ($R_h \sim 100 \text{ nm}$, $\sim 70 \text{ nm}$ et $\sim 50 \text{ nm}$ respectivement).

LA SONICATION DES LIPOSOMES

La sonication est la méthode à utiliser pour produire de très petits liposomes ($R_h \sim 30 \text{ nm}$). La suspension de MLV est ici soumise à des ultrasons d'une fréquence de 20 kHz en introduisant une sonde en titane dans la solution. L'énergie produite par les ultrasons va entraîner la fragmentation des MLV en très petits liposomes unilamellaires. Deux cycles de dix minutes d'ultrasons ont été réalisés avec une pause de cinq minutes entre les deux cycles pour faire redescendre la température. Les débris de titane et de lipides ont ensuite

été éliminés par centrifugation (100 000 rpm TLC 120.3) pendant 25 minutes.

3.5.2 DÉTERMINATION DE LA TAILLE DES LIPOSOMES

La distribution de taille des liposomes a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (ou *Dynamic Light Scattering* (DLS)). Cette technique consiste à mesurer les variations d'intensité de la lumière diffusée par la suspension. En raison de l'agitation thermique, les particules en solution sont animées par un mouvement aléatoire, connu sous le nom de mouvement Brownien. Le mouvement Brownien des particules en suspension fait que la lumière est diffusée à différentes intensités. L'analyse de ces fluctuations d'intensité donne le coefficient de diffusion D et donc la taille R_h de la particule par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h}$$

où k_b est la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité du solvant. Ainsi, plus la particule est grande (*i.e.* plus R_h est grand), plus sa diffusion est lente.

L'appareil que nous avons utilisé (DynaPro) fournit un rayon hydrodynamique, défini comme le rayon d'une sphère théorique qui diffuse dans le solvant à la même vitesse que la particule étudiée. Pour cela il calcule des fonctions d'autocorrélation qui quantifient les fluctuations d'intensité de diffusion de la lumière émise par les particules en solution entre chaque mesure. Dans ce travail nous avons mesuré séquentiellement douze fonctions d'autocorrélation (différence du signal à l'instant $t + dt$ par rapport à t) pour obtenir la distribution des tailles des liposomes.

3.5.3 DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DU PEPTIDE

La structure secondaire du motif ALPS a été évaluée par spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD).

Le phénomène de CD repose sur la capacité d'une molécule possédant un chromophore (*e.g.* la fonction amide de la liaison peptidique) à proximité d'un atome chiral (*e.g.* le carbone alpha d'un acide aminé), d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche comme illustré dans la Figure 3.17.

L'ellipticité (θ) est l'angle de l'ellipse $\left(\tan(\theta) = \frac{\text{petit axe}}{\text{grand axe}} \right)$. La relation reliant la différence d'absorbance gauche et droite et l'ellipticité est donnée par l'équation :

$$\text{Ellipticité} = \theta = \frac{2,303}{4} \times \frac{180}{\pi} \times (A_G - A_D)$$

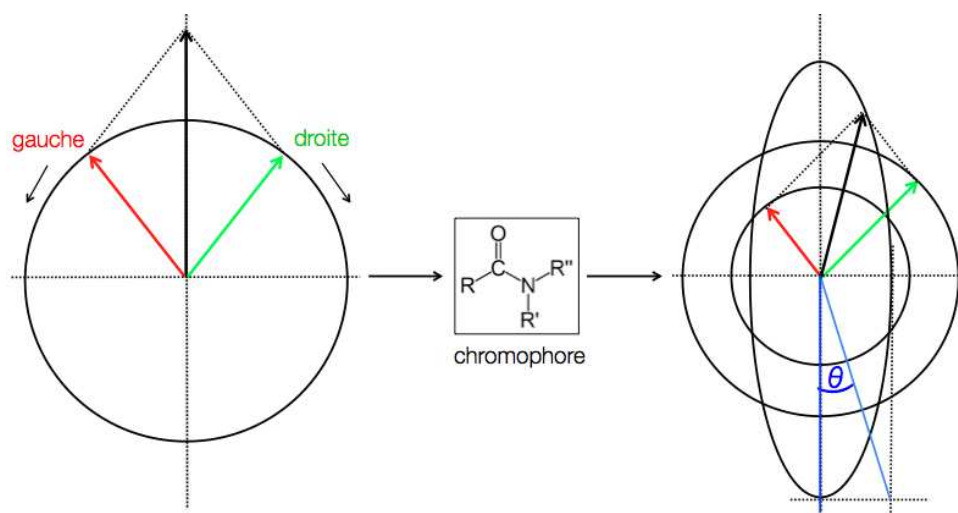


FIGURE 3.17 – Phénomène de dichroïsme circulaire. Après interaction avec un chromophore à proximité d'un atome chiral, la différence d'absorbance entre la lumière polarisée circulairement à droite (flèche verte) et la lumière polarisée circulairement à gauche (flèche rouge) donne une ellipse d'angle Θ .

où θ est l'ellipticité en millidegrés (mdeg), A_G l'absorbance gauche et A_D l'absorbance droite.

En tenant compte de la concentration de la molécule, du nombre de résidus et de la longueur du trajet optique, on définit l'ellipticité molaire moyenne par résidu (ou *Mean Residue molar Ellipticity* (MRE)) qui s'exprime en $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$:

$$\Theta = \theta \times \frac{1}{(10.n.C.l)}$$

où Θ est l'ellipticité molaire moyenne par résidu, θ est l'ellipticité en millidegré, n le nombre de résidus, C la concentration de l'échantillon (en mol/l) et l la longueur de la cuve (en cm).

Pour les protéines (ou les peptides), la mesure du CD dans l'UV lointain (180-260 nm), zone d'absorption de la fonction amide de la liaison peptidique, contient des informations sur leur structure secondaire : hélice α , feuillet β ou structures aléatoires (*random coil*) comme représenté dans la Figure 3.18.

On voit que :

- Le spectre caractéristique d'une hélice α présente deux minima négatif à 208 et 222 nm et un pic positif très intense à 190 nm,
- Le spectre caractéristique d'un feuillet β présente un minimum à 217 nm (variable en fonction qu'il soit parallèle, anti-parallèle, intra ou intermoléculaire) et un pic positif à 195 nm,
- Le spectre caractéristique d'une structure aléatoire (*random coil*) présente un mi-

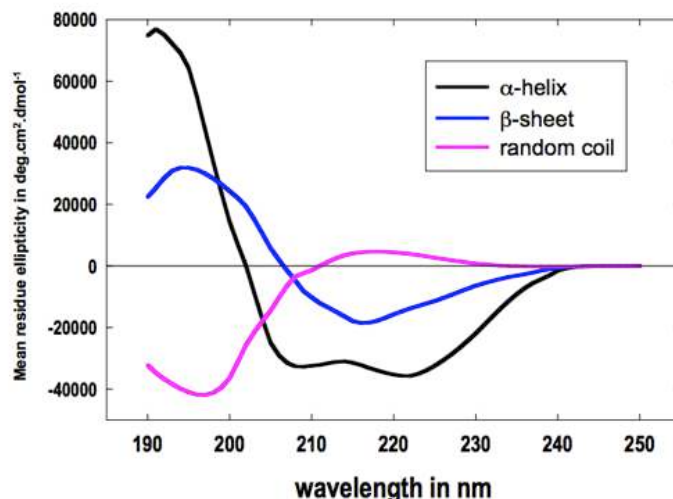


FIGURE 3.18 – Spectre de dichroïsme circulaire de différentes structures secondaires. Polylysine à pH 7 (en random coil), à pH 10.8 (en hélice α) et à pH 11.1 (en feuillet β). Tiré de Diderot en ligne.

nimum à 200 nm et une bande à 220 nm qui peut être légèrement positive ou négative.

Comme le CD présente l'avantage de pouvoir travailler avec une faible quantité de matériel (ici 25 et 50 μM pour le peptide) et sans être limité par la taille de la molécule, il permet de faire des évaluations structurales préliminaires avant d'utiliser des techniques plus lourdes telles que la RMN et la cristallographie aux rayons X.

Dans ce travail les mesures de CD ont été réalisées avec un spectromètre Jasco J-815. Nous avons utilisé une cuve en quartz dont le trajet optique est de 0,05 cm pour les mesures à température ambiante et de 0.1 cm (cuve Hellma) pour les mesures à haute température. Chaque spectre correspond à la moyenne de 10 acquisitions enregistrées de 200 à 260 nm (en dessous de 200 nm le signal était trop bruité à cause des liposomes de grandes taille qui diffusent la lumière) avec un pas de 0,5 ou 1 nm. Tous les spectres CD ont été corrigés de l'absorbance non spécifique du tampon et des liposomes en soustrayant chaque spectre CD à lui même mais en absence de peptide.

3.5.4 ESTIMATION DU TAUX D'HÉLICITÉ DU PEPTIDE

Le taux d'hélicité du peptide a été estimé à partir de la relation proposée par Wieprecht *et al.* (1999) comme suit :

$$f_h = \frac{[\theta]_{222} - [\theta]_{coil}}{[\theta]_{hélice} - [\theta]_{coil}} \quad (3.10)$$

$$[\theta]_{hélice} = -40000 \left(1 - \frac{2,5}{n} \right) + 100t \quad (3.11)$$

$$[\theta]_{coil} = 640 - 45t \quad (3.12)$$

où $[\theta]_{222}$, $[\theta]_{hélice}$ et $[\theta]_{coil}$ représentent respectivement la MRE à 222 nm obtenue par dichroïsme circulaire (en $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$), l'ellipticité à 222 nm si le peptide était totalement en hélice et l'ellipticité à 222 nm si le peptide était totalement en *random coil* (non structuré), n le nombre de résidus et t la température (en deg).

3.5.5 DÉTERMINATION DE L'ÉNERGIE LIBRE DE TRANSFERT DE L'EAU VERS LA MEMBRANE

Pour déterminer l'énergie libre ΔG associé au transfert du motif ALPS de la phase aqueuse vers la membrane, nous avons utilisé la même approche que dans Fernandez-Vidal *et al.* (2011).

Par définition :

$$\Delta G = -RT \ln K_X \quad (3.13)$$

où R est la constante des gaz parfaits ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T la température (en Kelvin) et K_X la fraction molaire. Ainsi, une petite variation de ΔG correspond à une grande variation de K_X .

Le fraction molaire K_X est donnée par :

$$K_X = \frac{[P]_{bilayer} / [L]}{[P]_{water} / [W]} \quad (3.14)$$

où $[P]_{bilayer}$ et $[P]_{water}$ sont les concentrations molaires de peptides dans la membrane et dans l'eau respectivement et $[L]$ et $[W]$ sont les concentrations molaires de lipides et de l'eau (55,3 mol/L).

Comme $[P]_{total} = [P]_{bilayer} + [P]_{water}$, il est facile de montrer que :

$$f_p = \frac{K_X [L]}{[W] + K_X [L]} \quad (3.15)$$

où f_p est la fraction de peptides liés à la membrane.

Enfin, K_X et s_{bond} sont obtenus en ajustant l'équation suivante :

$$S([L]) = f_p * s_{bond} + (1 - f_p) * s_{free} \quad (3.16)$$

où $S([L])$ est la MRE à 222 nm en fonction de la concentration de lipides, s_{bond} est l'ellipticité maximale quand tous les peptides sont liés à la membrane et s_{free} est l'ellipticité minimale (*i.e.* en absence de lipides).

4

Étude d’une bicouche plate enrichie en DOG

La principale fonction du motif ALPS est de sentir la courbure membranaire. Cependant, le motif ALPS se lie à la fois sur des membranes courbées et sur des membranes plates enrichies en lipides coniques comme le 1,2-dioleoyl-sn-glycerol (DOG) (Figure 4.1). Au vu de cette observation, il a été proposé que ce n’est pas la courbure elle-même qui est reconnue par le motif ALPS mais plutôt les défauts de *packing* induits par la courbure membranaire (Bigay *et al.*, 2005). Pour aborder cette question complexe, nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux lipides puis dans un second temps à l’interaction du motif ALPS avec la membrane.

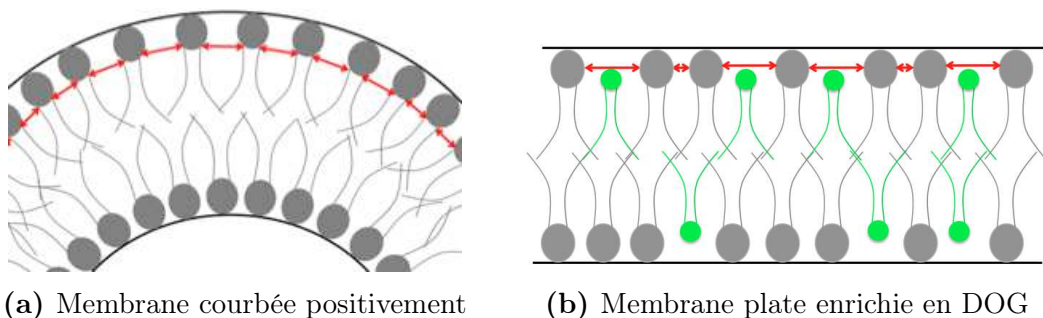


FIGURE 4.1 – Illustration des défauts de *packing* entre les lipides. Les flèches rouges représentent les défauts.

Dans ce chapitre, nous allons examiner par DM une membrane plate enrichie en

DOG dans le but de caractériser et de quantifier finement ses défauts de *packing* au niveau atomique. Nous allons voir si l'ajout du DOG dans une membrane plate de 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) permet de mimer les mêmes défauts de *packing* entre les lipides que ceux retrouvés dans le feuillet externe d'une membrane courbée positivement et comment le DOG modifie les propriétés structurales, dynamiques et élastiques de la membrane.

Nous avons utilisé une proportion molaire 85/15 DOPC/DOG pour construire la bicouche enrichie en DOG car jusqu'à 15% de DOG la bicouche reste en phase lamellaire comme montré dans le diagramme de phase de la Figure 4.2.

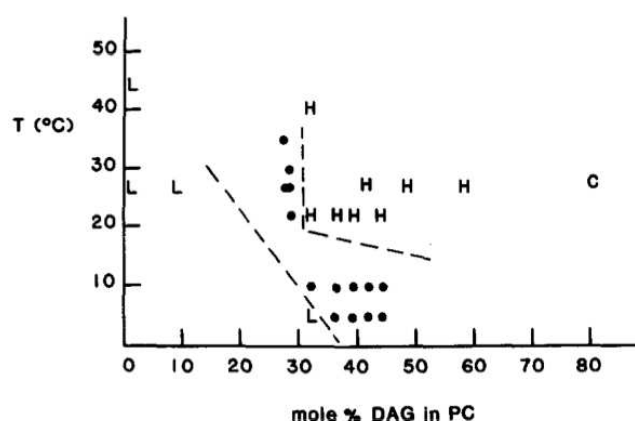


FIGURE 4.2 – Structures formées par des mélanges DAG dans une bicouche de PC. L représente la phase lamellaire simple, H la phase hexagonale simple, les ronds noirs la coexistence de phases (L et H), C la phase cubique. Tiré de Das et Rand (1984).

Tous les résultats qui vont suivre sont issus exclusivement de simulations de DM tout-atome afin de décrire en détail les interactions entre les lipides et entre les lipides et les molécules d'eau.

4.1 EST-CE-QUE LE DOG CRÉE DIRECTEMENT DES CAVITÉS À L'INTERFACE DE LA MEMBRANE ?

Le DOG diffère du DOPC seulement par sa tête polaire : un groupe hydroxyle pour le DOG contre un groupe phosphate + une choline pour le DOPC (voir Tableau 3.2). Naïvement on pourrait penser que le remplacement d'un certain nombre de DOPC en DOG devrait affecter la densité massique dans la région des têtes polaires sans altérer la région hydrophobe. En d'autres termes, le remplacement d'un DOPC en DOG devrait créer des vides à l'interface de la bicouche juste au dessus des DOG (correspondant au manque de la phosphocholine) comme montré dans la Figure 4.1. Toutefois, nous allons voir par la suite que cette image simpliste ne reflète pas complètement la réalité.

4.1.1 PARTITIONNEMENT DES LIPIDES DANS LA BICOUCHE

Le partitionnement des lipides dans la bicouche a été évalué à partir de la densité massique de chaque composant du système calculée le long de la normale à la membrane comme illustré dans la Figure 4.3 (c et d).

La densité dans une bicouche est maximale à l'interface polaire/apolaire (plus précisément au niveau phosphates des lipides) et minimale au centre de la bicouche (c'est-à-dire au niveau des queues des lipides). (Kucerka *et al.*, 2005a) (Tristram-Nagle *et al.*, 1998) (Wiener et White, 1992).

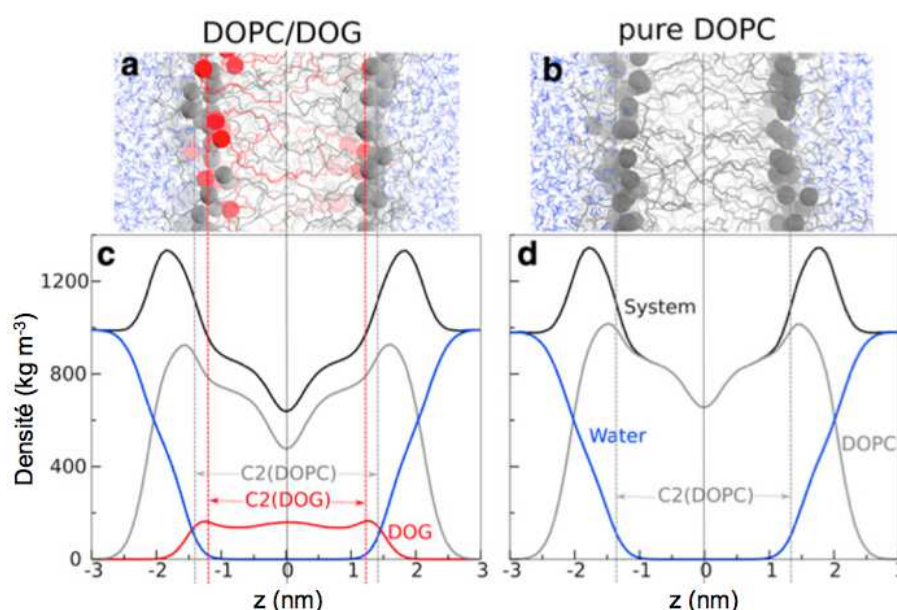


FIGURE 4.3 – Densité dans les bicouches DOPC/DOG et DOPC. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

Ici nous observons que la densité des DOG (courbe rouge dans la Figure 4.3 c) est maximale à la fois au centre de la bicouche et au niveau des têtes polaires des lipides, tandis que pour les DOPC, elle est minimale au centre de la membrane et maximale au niveau des têtes polaires des lipides comme attendu (courbe grise dans la Figure 4.3, c et d).

De plus, le pic de densité du premier carbone aliphatique (atome C2) des DOG (ligne rouge en pointillé) est plus proche du centre de la bicouche que celui des DOPC (ligne grise en pointillé). Cette différence de partitionnement se traduit par une augmentation de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche qui passe de $2,63 \pm 0,11$ nm à $2,89 \pm 0,08$ nm, après l'introduction du DOG dans la bicouche.

Prises ensembles, ces observations suggèrent que les DOG se partitionnent plus profondément dans la bicouche que les DOPC provoquant ainsi un épaissement de la bicouche

et une *interdigitation* (chevauchement) des chaînes aliphatiques des DOG au centre de la bicouche. Ce résultat est en accord avec des expériences de résonance paramagnétique électronique qui ont montré que le DAG (forme générale dont fait partie le DOG) est localisé plus profondément dans une bicouche de phospholipides que les lipides adjacents (Goñi et Alonso, 1999).

D'autre part, l'intersection de la densité de l'eau avec la densité des DOG est autour de 1,5 nm contre 2 nm pour les DOPC suggérant que bien que les DOG soient plus enfouis dans la bicouche, leurs têtes polaires restent hydratées par l'eau.

Regardons maintenant de plus près l'hydratation des têtes polaires des lipides dans les bicouches de DOPC et de DOPC/DOG.

4.1.2 HYDRATATION DES TÊTES POLAIRES DES LIPIDES

L'hydratation des têtes polaires des lipides a été évaluée à partir de la distribution radiale 3D entre l'atome d'oxygène de l'eau (atome OW) et l'atome d'oxygène nommé O4 des lipides comme illustré dans la Figure 4.4. Pour le DOPC, l'atome O4 est l'oxygène qui connecte le glycérol au groupe phosphate tandis que pour le DOG, c'est l'oxygène du groupe hydroxyle. La structure de ces deux lipides est montrée dans la Figure 3.9.

Nous observons que le premier pic de la distribution radiale (à $\sim 0,28$ nm) est plus haut dans une bicouche de DOPC/DOG (courbe rouge de la Figure 4.4) comparée à une bicouche de DOPC (courbe noire de la Figure 4.4). Inversement, le second pic (à 0,5 nm) est plus bas dans la bicouche de DOPC/DOG comparée à la bicouche de DOPC. Comme le DOG est à la fois un donneur et un accepteur de liaison d'hydrogène contrairement au DOPC, il est capable de former des liaisons avec les molécules d'eau mais, d'un autre côté, comme il est plus enfoui dans la bicouche il est moins accessible par la seconde couche d'eau.

Maintenant si on regarde en détail la distribution radiale de l'atome O4 du DOPC et du DOG, elle est maximale à $\sim 0,28$ nm pour les O4 des DOG (courbe verte de la Figure 4.4) et à 0,5 nm pour les O4 des DOPC (courbe grise de la Figure 4.4).

Prises ensembles, ces observations suggèrent que les O4 des DOG sont plus hydratés par la première couche d'eau tandis que les O4 des DOPC sont plus hydratés par la seconde couche d'eau. Comme attendu, la présence du DOG dans une bicouche de DOPC mène à une hydratation plus importante de la région polaire.

Regardons maintenant comment le DOG affecte l'orientation moyenne des lipides dans la membrane.

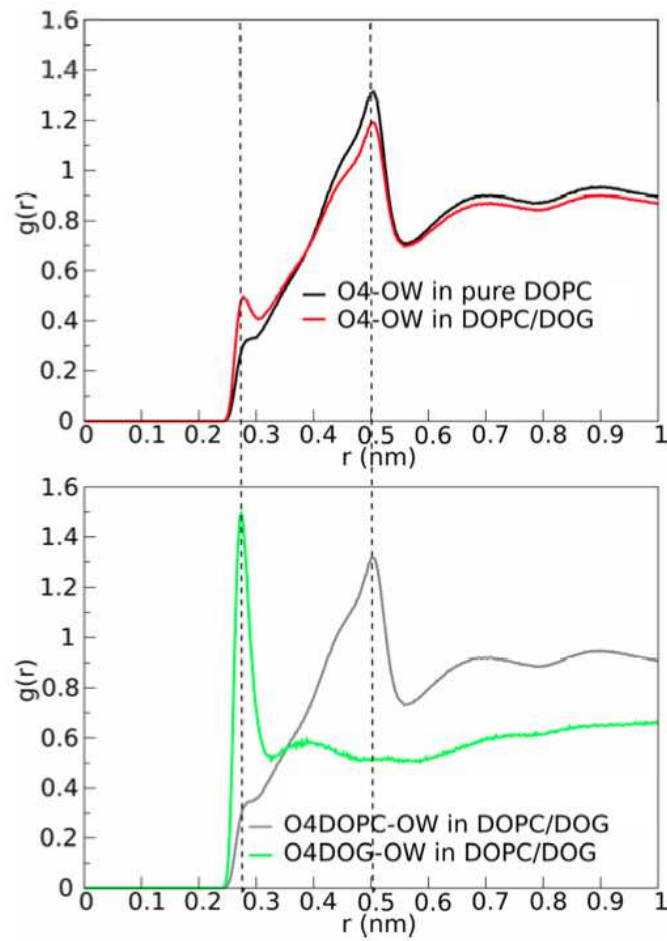


FIGURE 4.4 – Distribution radiale $g(r)$ des atomes d'oxygène O4 des lipides vs les atomes d'oxygène de l'eau OW. L'atome O4 correspond à l'atome d'oxygène connectant le glycérol et le groupe phosphate dans le DOPC, tandis que c'est l'oxygène du groupe hydroxyle dans le DOG. La figure du haut montre n'importe quel atome O4 pour les deux systèmes (DOPC pur et DOPC/DOG). Dans la figure du bas, le détail est donné pour le DOG et le DOPC dans la bicouche mixte DOPC/DOG. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

4.1.3 PARAMÈTRE D'ORDRE DES LIPIDES

L'orientation des lipides par rapport à la normale à la membrane a été évaluée à partir du paramètre d'ordre. Plus le paramètre d'ordre est proche de 1 moins les atomes sont mobiles (plus l'ordre augmente) et plus le paramètre d'ordre est proche de 0 moins les atomes sont mobiles (plus l'ordre diminue).

En présence de DOG, les DOPC sont plus ordonnés dans la queue hydrophobe et moins ordonnés dans la tête polaire pour les chaînes *sn*-1 et *sn*-2 (Figure 4.5). Comme le DOG se partitionne plus au centre de la bicouche que le DOPC en raison de sa petite tête, d'un côté il permet des contacts plus proches entre les queues hydrophobes réduisant ainsi leur mobilité et d'un autre côté il augmente l'espace entre les têtes polaires augmentant

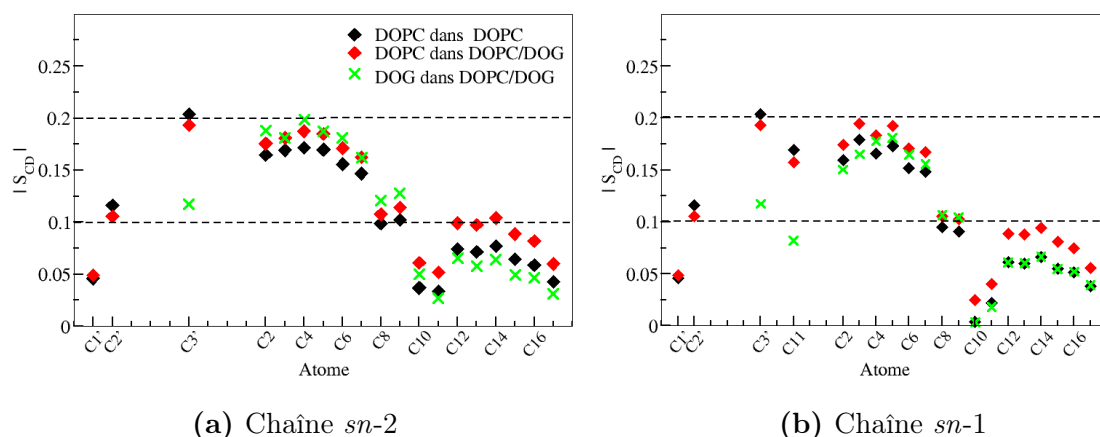


FIGURE 4.5 – Paramètre d'ordre du DOPC et du DOG dans les bicouches DOPC et DOPC/DOG. Le DOPC est représenté en noir dans une bicouche de DOPC et en rouge dans une bicouche de DOPC/DOG. Le DOG est représenté en vert dans une bicouche de DOPC/DOG.

ainsi leur mobilité. Comparés aux DOPC présents dans une bicouche de DOPC/DOG (losanges rouges), les DOG (croix vertes) sont moins ordonnés sur toute la chaîne *sn*-1 tandis que sur la chaîne *sn*-2 ils sont moins ordonnés seulement au niveau du carbone portant l'hydroxyle (atome C3') et après la double liaison (entre les atomes C9 et C10). Comme la chaîne *sn*-1 est plus longue d'un carbone (atome C11) que la chaîne *sn*-2, elle est plus mobile car elle peut plonger plus profondément dans la membrane où la densité est la plus basse (Figure 4.3).

4.2 COMMENT LE DOG MODIFIE LES PROPRIÉTÉS DYNAMIQUES ET ÉLASTIQUES DE LA MEMBRANE ?

Les propriétés dynamiques (mouvements latéraux et horizontaux) et élastiques (déformations géométriques) de la membrane jouent un rôle essentiel dans l'interaction de protéines périphériques (ou de peptides interfaciaux) avec la membrane. Regardons donc l'effet du DOG sur ces deux propriétés.

4.2.1 PROPRIÉTÉS DYNAMIQUES

Les propriétés dynamiques que nous avons analysées sont la diffusion latérale et la translocation d'un feuillet à l'autre de la bicouche.

Nous observons que la diffusion du DOPC est très similaire dans les bicouches de DOPC et de DOPC/DOG (Tableau 4.1). De plus, elle est du même ordre de grandeur

que la valeur expérimentale obtenue par *Pulsed field gradient NMR* ($10 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (Filippov *et al.*, 2003). Par conséquent, le DOG semble sans effet sur la diffusion latérale des DOPC.

Concernant la diffusion latérale des DOG, elle est légèrement plus basse que celle des DOPC bien que la différence ne soit pas significative (Tableau 4.1). Des simulations plus longues seraient nécessaires pour confirmer ce résultat.

	DOPC	DOPC/DOG
Diffusion des DOPC ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	$8,8 \pm 1,1$	$8,7 \pm 0,8$
Diffusion des DOG ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	-	$7,6 \pm 1,6$

Tableau 4.1 – Diffusion latérale des lipides dans les bicouches de DOPC et de DOPC/DOG.

La translocation des lipides d’un feuillet à l’autre de la bicouche a été estimée à partir d’un profil d’énergie libre (PMF) le long de la normale à la membrane calculé par *Umbrella Sampling* (US). Pour déplacer le DOPC et le DOG de l’interface polaire/apolaire vers le centre de la bicouche, nous avons utilisé respectivement l’atome de phosphore et l’atome d’oxygène de l’hydroxyle (Figure 4.6).

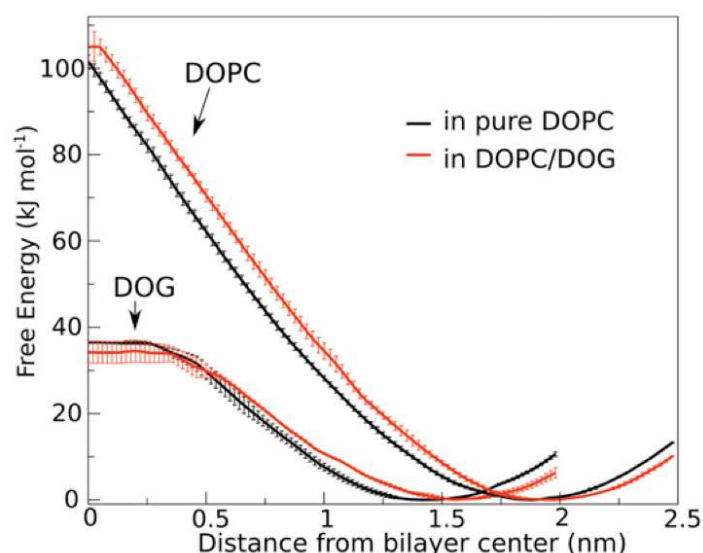


FIGURE 4.6 – PMF pour transférer la tête polaire du DOPC et du DOG de l’interface polaire/apolaire vers le centre d’une bicouche de DOPC ou de DOPC/DOG. La contrainte a été placée sur l’atome de phosphore pour le DOPC et sur l’atome d’oxygène de l’hydroxyle pour le DOG. Les PMF sont montrés avec les barres d’erreur. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

L’énergie libre au centre de la bicouche est ~ 100 kJ/mol pour le DOPC et ~ 35 kJ/mol pour le DOG quelle que soit la bicouche (DOPC ou DOPC/DOG). Ce résultat suggère deux conclusions : 1) la translocation d’un DOPC vers le centre de la bicouche nécessite trois fois plus d’énergie que le DOG et 2) la présence du DOG dans la bicouche de DOPC ne facilite ni la translocation du DOPC, ni la translocation du DOG.

Par ailleurs, le PMF du DOG montre un plateau près du centre de la bicouche ($z < 0,35$ nm), montrant que la translocation du DOG vers le centre de la bicouche s’accompagne d’une déshydratation de sa tête polaire. La tête polaire du DOPC reste quant à elle hydratée par l’eau même au centre de la bicouche pour minimiser son exposition avec les queues hydrophobes des lipides comme illustré dans la Figure 4.7, d’où l’absence de plateau.

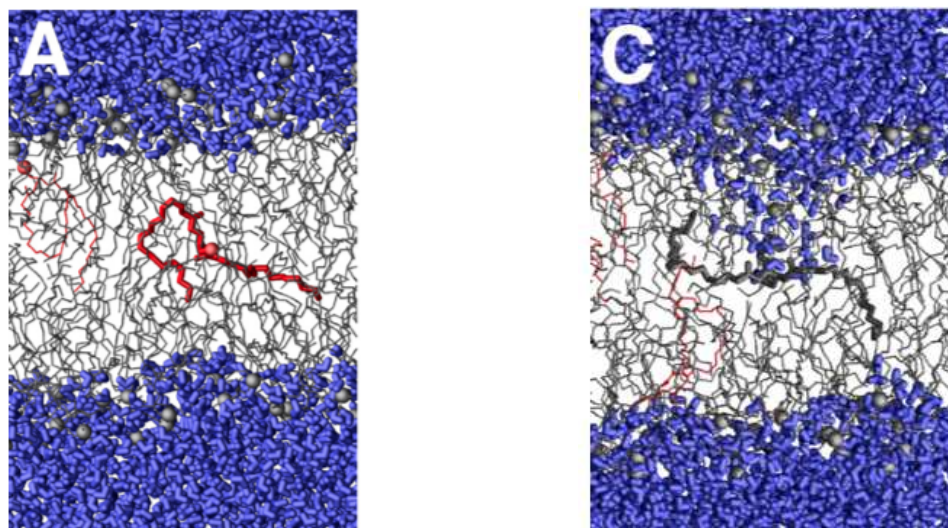


FIGURE 4.7 – Cliché durant la translocation du DOG et du DOPC au centre de la bicouche. À gauche le DOG (rouge) et à droite le DOPC (gris). Le reste des lipides est représenté en traits fins gris et les molécules d’eau sont montrées en sphères bleues. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

Enfin, l’énergie libre est minimale à $\sim 1,5$ nm pour le DOG et à $\sim 1,8$ nm pour le DOPC dans les deux bicouches (DOPC et DOPC/DOG) ce qui est en accord avec les partitionnements du DOG et du DOPC observés par l’analyse de la densité (Figure 4.3).

4.2.2 PROPRIÉTÉS ÉLASTIQUES

Les propriétés élastiques que nous avons analysées sont la pression latérale, la compressibilité et la rigidité.

Un profil de pression latérale typique montre un pic très négatif dans la région de l’interface hydrophile/hydrophobe qui est entouré par deux pics positifs l’un au niveau des têtes polaires et l’autre au niveau des chaînes aliphatiques (voir Figure 4.8 f).

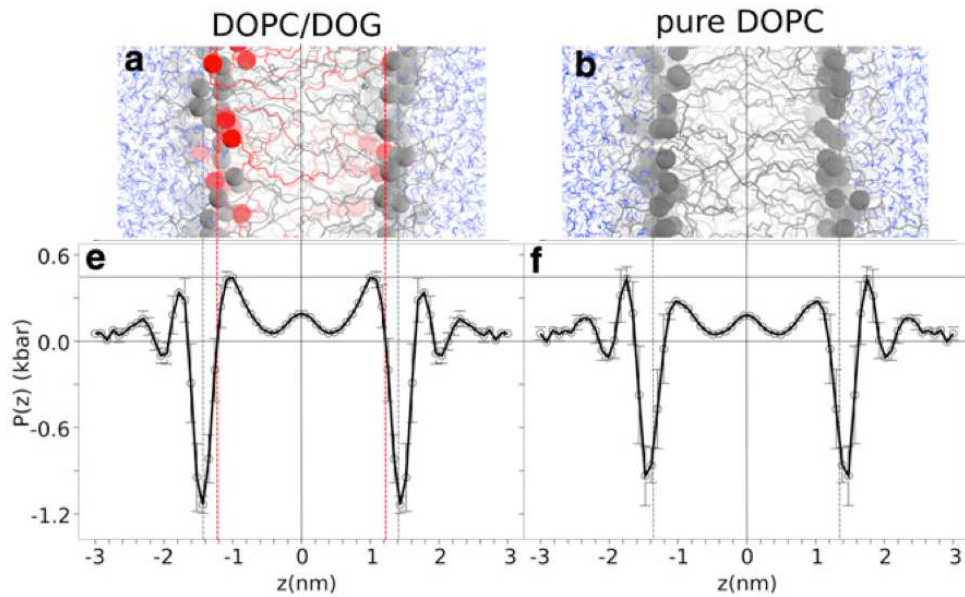


FIGURE 4.8 – Profil de pression latérale dans les bicouches de DOPC et de DOPC/DOG. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

Suite à l'ajout du DOG, le pic positif au niveau des chaînes aliphatiques (à $\pm 1,2$ nm) est deux fois plus élevé comparé à une bicouche de DOPC (Figure 4.8). D'après van den Brink-van der Laan *et al.* (2004), les perturbations attendues dans le profil de pression latérale suite à l'ajout de lipides coniques sont une diminution de la pression latérale au niveau des têtes polaires contrebalancée par une augmentation au niveau des chaînes aliphatiques pour faciliter l'adsorption des protéines. Ici, la diminution de la pression dans la région des têtes polaires (autour de ± 2 nm) est assez modeste (dans les barres d'erreur de nos mesures) et ne peut pas contrebalancer l'augmentation de la pression dans la région des chaînes aliphatiques. À la place, la pression totale dans la bicouche de DOPC/DOG est maintenue à zéro par une diminution de la pression dans la région de l'interface hydrophile/hydrophobe (à $\pm 1,5$ nm). Des simulations plus longues permettraient peut-être de réduire nos barres d'erreur et donc d'observer une diminution significative dans la région des têtes polaires.

Comme la pression latérale est connectée à la compressibilité et à la rigidité de la bicouche (Ollila *et al.*, 2007b), nous nous attendions à une variation de ces deux dernières suite à l'ajout du DOG dans une bicouche de DOPC. Ici, la présence du DOG diminue de 35% le module de rigidité sans modifier significativement le module de compressibilité (Tableau 4.2).

Il est intéressant de noter que l'augmentation d'épaisseur d'une bicouche est généralement associée avec une augmentation dans la rigidité (*e.g.* $20,5 \pm 2,4$ kT et $29,0 \pm 3,6$ kT

	DOPC	DOPC/DOG
Module de compressibilité K_A (N m ⁻¹)	$0,331 \pm 0,006$	$0,351 \pm 0,027$
Module de rigidité (kT)	$21,4 \pm 0,6$	$14,3 \pm 1,4$

Tableau 4.2 – Modules de compressibilité et de rigidité dans les bicouches de DOPC et DOPC/DOG.

respectivement pour di-C18:1_{c9} et di-C22:1_{c9}) (Rawicz *et al.*, 2000). Cependant dans notre cas, l’augmentation de l’épaisseur ne résulte pas de l’augmentation de la longueur des chaînes aliphatiques mais de la différence de partitionnement entre les deux lipides dans la bicouche ainsi que de l’augmentation de l’ordre dans les chaînes aliphatiques des DOPC (voir 4.1 et Gonzalez-Rubio *et al.* (2011)).

En résumé, le DOG se partitionne plus au centre de la bicouche tout en conservant sa tête polaire bien hydratée par l’eau ce qui provoque :

- sur les DOPC une diminution de mobilité dans la queue hydrophobe et une augmentation de mobilité dans la tête polaire,
- sur la bicouche une augmentation de la pression latérale au niveau des chaînes aliphatiques et une diminution de la rigidité.

Au vu des ces observations nous ne pouvons pas savoir si le DOG crée directement des vides à l’interface de la membrane. Nous pouvons seulement dire qu’en présence de DOG l’eau pénètre plus profondément dans la bicouche et que la tête polaire des DOPC est plus mobile. De plus, il est difficile de comprendre comment le DOG crée des défauts à l’interface de la membrane tandis qu’il est plus enfoui que le DOPC. Pour répondre à cette question nous avons développé une méthode permettant de caractériser et quantifier les défauts de *packing* entre les têtes polaires des lipides.

4.3 CARACTÉRISATION ET QUANTIFICATION DES DÉFAUTS DE PACKING ENTRE LES TÊTES POLAIRES DES LIPIDES

Une bicouche lipidique est composée d’un coeur hydrophobe occupé par les chaînes aliphatiques et de deux interfaces hydrophile/hydrophobe. Ainsi, si de l’eau est capable d’atteindre les chaînes aliphatiques des lipides cela signifie que les têtes polaires ne sont pas suffisamment serrées pour empêcher l’eau d’accéder au coeur hydrophobe de la membrane. Dans une telle situation on dit que la bicouche présente des défauts de *packing* entre les têtes polaires des lipides (voir section 2.2.3).

4.3.1 LES MÉTHODES UTILISÉES POUR CARACTÉRISER LES DÉFAUTS DE PACKING

Pour caractériser et quantifier ces défauts, nous avons utilisé l'approche proposée par Cui *et al.* (2011) et développé une nouvelle méthode. Ces deux méthodes sont illustrés dans la Figure 4.9.

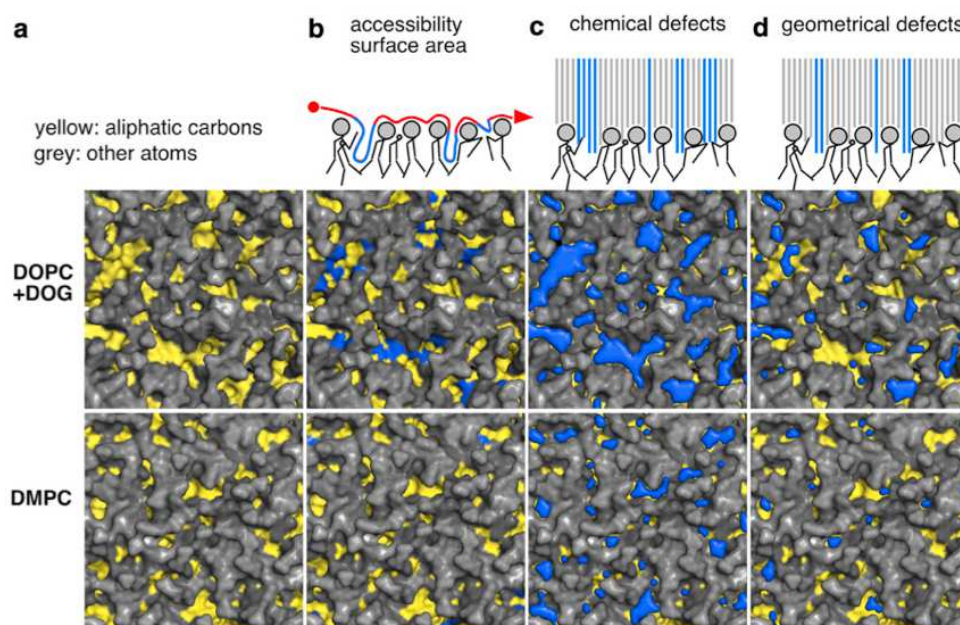


FIGURE 4.9 – Détection des défauts de *packing*. En haut, les méthodes pour identifier les défauts à l'interface de membranes (b : méthode proposée par Cui *et al.* (2011), c et d : notre nouvelle méthode). En bas, les images de la surface des bicouches DOPC/DOG et DMPC avec les têtes polaires en gris, les carbones aliphatiques en jaune et les défauts en bleu. Quelle que soit la méthode utilisée, les défauts de *packing* sont plus abondants et plus grands dans une bicouche de DOPC/DOG que dans une bicouche de DMPC. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

La méthode proposée par Cui *et al.* (2011), utilise l'*Accessibility Surface Area* (ASA) et consiste à évaluer l'accessibilité des carbones aliphatiques en faisant rouler une sonde de 0,3 nm sur la surface de la bicouche (Figure 4.9 b).

Notre nouvelle méthode consiste à évaluer l'accessibilité des carbones aliphatiques en utilisant une grille de 0,1 nm de résolution comme illustré dans la Figure 4.10. Pour chaque point de la grille, la position z est scannée en partant de l'extérieur de la bicouche et en descendant vers le centre de la bicouche. À chaque position z la méthode cherche un éventuel chevauchement (*overlap*) avec n'importe quel atome de ce feuillet. Une distance d entre le centre du point de la grille et le centre de chaque atome est calculée. Un chevauchement est assigné quand d est plus petit que le rayon de van der Waals de l'atome + la demi-diagonale du point de la grille. Par comparaison avec la méthode proposée par

Cui *et al.* (2011), notre méthode permet de caractériser deux types de défauts peuvent être caractérisés en fonction de la nature du premier atome rencontré :

- défaut chimique si l'atome rencontré est un carbone aliphatique (Figure 4.9 c),
- défaut géométrique si l'atome rencontré est un carbone aliphatique et s'il est situé à 0,1 nm en dessous du niveau des glycérols (Figure 4.9 d).

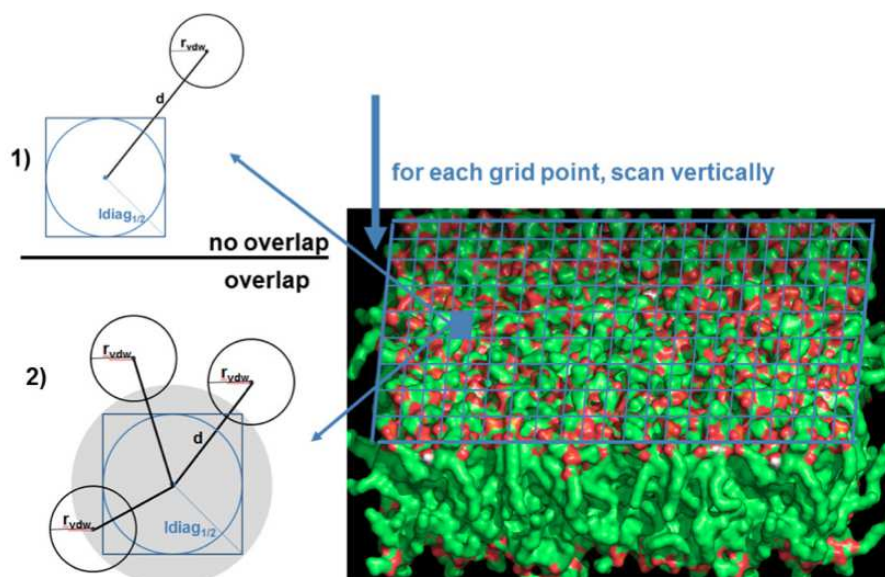


FIGURE 4.10 – Illustration de notre nouvelle méthode pour détecter les défauts de *packing*. La grille est représentée en bleu clair au dessus de la bicouche montrée en vert (les atomes d'oxygène sont en rouges). Noter que la taille de chaque point de la grille a été augmentée pour plus de clarté. À gauche de la membrane est illustrée la manière dont nous avons évalué un chevauchement entre un atome et un point de la grille. Il y a chevauchement si le rayon de van der Waals de l'atome (r_{vdw}) + la demi diagonale du point de la grille ($l_{diag}/2$) est inférieur à la distance d (distance entre le centre du point de la grille et le centre de l'atome). Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

4.3.2 EST-CE-QUE L'AJOUT DU DOG AUGMENTE LA PROBABILITÉ D'OCCURRENCE DES DÉFAUTS DE PACKING DANS L'INTERFACE HYDROPHILE/HYDROPHOBE ?

La figure 4.9 montre les défauts de *packing* sur un cliché unique. Afin de collecter des statistiques plus fines, nous avons effectué la même mesure sur une trajectoire. La Figure 4.11 montre la distribution de la taille des défauts pour différentes compositions lipidiques (DMPC, POPC, DOPC et DOPC/DOG) obtenue avec la méthode ASA et notre nouvelle méthode.

Pour toutes les compositions lipidiques et pour les trois types de défauts (ASA, géométriques et chimiques), la distribution est exponentielle, c'est-à-dire que la probabilité des grands défauts décroît rapidement. De plus, toutes les distributions suggèrent un se-

cond régime (qui ne suit pas une pure décroissance exponentielle) pour de très grands défauts comme observé dans (Cui *et al.*, 2011).

Quelle que soit la méthode utilisée, la constante de décroissance exponentielle (obtenue à partir de la distribution de la taille des défauts) diminue quand les chaînes aliphatiques saturées sont remplacées par des chaînes mono-insaturées ou quand le DOG est introduit dans la bicouche (Tableau 4.3). La probabilité d'occurrence des grands défauts suit l'ordre : DMPC < POPC < DOPC < DOPC/DOG. Ce résultat montre que l'ajout du DOG dans la bicouche permet d'augmenter l'occurrence des défauts de *packing* dans l'interface hydrophobe/hydrophile.

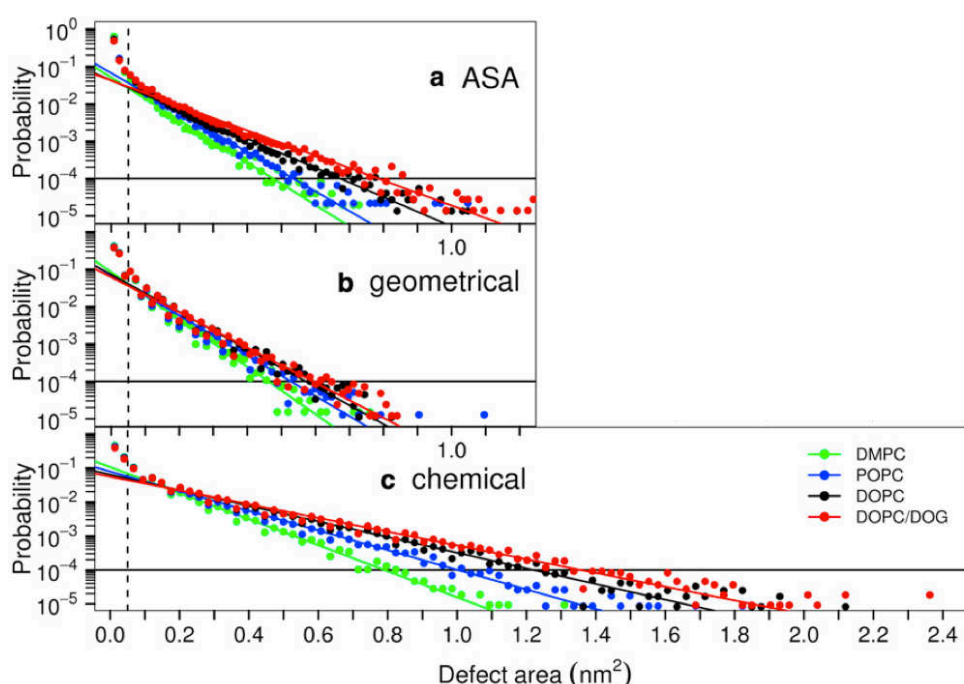


FIGURE 4.11 – Distribution de la taille des défauts de *packing* dans différentes bicouches. Les graphiques montrent la probabilité de trouver un défaut de taille définie : (a) par la méthode de Cui *et al.* (2011) et (b et c) par notre nouvelle méthode. Le code couleur est le suivant : vert, DOPC ; bleu, POPC ; noire, DOPC ; rouge, DOPC/DOG. Chaque ligne en trait plein est un fit de la distribution exponentielle pour les défauts plus grands que $0,05 \text{ nm}^2$ et avec une probabilité $\geq 10^{-4}$. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

Nature du défaut	DMPC	POPC	DOPC	DOPC/DOG
ASA	13,1	12,1	9,0	7,7
géométrique	14,6	12,4	11,5	10,8
chimique	8,8	6,7	5,3	4,7

Tableau 4.3 – Constantes de décroissance en nm^{-2} dans différentes bicouches.

Par ailleurs, les trois approches identifient des défauts de différentes tailles (Figure 4.11). Les défauts chimiques correspondent essentiellement à toutes les régions où les atomes aliphatiques sont visibles depuis la surface de la membrane, indépendamment de leur profondeur (Figure 4.9 c). Les défauts géométriques sont plus petits parce que leur définition est plus restreinte (Figure 4.9 d). Finalement, la méthode ASA détecte les défauts de taille moyenne (Figure 4.9 b) mais les résultats dépendent du choix de la taille de la sonde (ici 0,3 nm comme dans Cui *et al.* (2011)); le changement de la taille de la sonde impliquerait des aires de défauts différentes. Le principal avantage de l’approche ASA est qu’elle n’est pas sensible à l’orientation des défauts parce que la sonde ne suit pas une direction préférentielle, tandis que notre nouvelle méthode détecte un défaut vertical plus facilement qu’un défaut oblique parce que la membrane est scannée le long de sa normale. Notre approche combine deux avantages : une fine résolution (0,1 nm) sans avoir besoin de définir une taille de sonde et la possibilité d’identifier les défauts pas seulement par leur chimie, mais aussi par leur profondeur.

4.3.3 EST-CE-QUE LES DÉFAUTS DE PACKING SE CO-LOCALISENT AVEC LE DOG ?

Pour savoir si les défauts de *packing* se situent à proximité des DOG, nous avons déterminé si les chaînes aliphatiques des DOG et des DOPC coïncidaient avec les défauts. Nous avons pour cela déterminé le pourcentage de la surface de chaque atome aliphatique se chevauchant avec les défauts chimiques ou géométriques comme illustré dans le Tableau 4.4.

Nature du défaut	DOG (%) ^a	DOPC (%) ^b
géométrique	1,4 ± 0,5	1,7 ± 0,4
chimique	5,4 ± 1,3	5,4 ± 0,7

Tableau 4.4 – Distribution spatiale de défauts de *packing* dans une bicouche DOPC/DOG. Après avoir déterminé les surfaces des chaînes aliphatiques occupées par le DOG et par le DOPC, nous avons déterminé le pourcentage de chaque surface qui correspond aux défauts chimiques ou géométriques. Dans cette analyse, nous retenons seulement les défauts plus grands que 0,1 nm². (a) Fraction de l’aire occupée par les défauts de *packing* dans l’aire totale des DOG. (b) Fraction de l’aire occupée par les défauts de *packing* dans l’aire totale des DOPC.

Les valeurs obtenues montrent que les défauts de *packing* ne sont pas présents en plus grand nombre dans la surface occupée par le DOG comparée au DOPC. Par conséquent, bien que le DOG augmente le nombre et la taille des défauts de *packing* à l’interface de la bicouche, il ne se co-localise pas avec les défauts, suggérant des perturbations globales plutôt que locales.

4.3.4 EST-CE-QUE LES DÉFAUTS INDUITS PAR LE DOG OU PAR LA COURBURE POSITIVE SONT SIMILAIRES ?

Nous avons vu que la distribution des défauts (Figure 4.11) pouvait être caractérisée par une quantité unique : le facteur de décroissance exponentielle en nm^{-2} (Tableau 4.3). Ainsi pour comparer les défauts de *packing* dans nos bicouches plates avec les défauts dans les bicouches plates et convexes DOPC/DOPS issus de Cui *et al.* (2011), nous avons utilisé le facteur de décroissance exponentielle comme illustré dans la Figure 4.12.

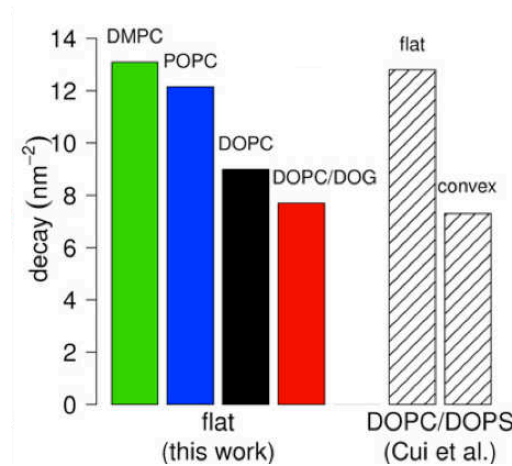


FIGURE 4.12 – Constantes de décroissance dans des membranes plates et dans une membrane courbée positivement. À gauche les valeurs obtenues à partir de la distribution de la Figure 4.11 (a). À droite les valeurs obtenues par Cui *et al.* (2011) sur une bicouche DOPC/DOPS en conformation plate ou convexe. Tiré de Vamparys *et al.* (2013).

La différence relative des défauts de *packing* entre les bicouches plates DMPC et DOPC/DOG est très similaire à celle entre une bicouche plate DOPC/DOPS et une bicouche convexe DOPC/DOPS. Les défauts induits par le DOG sont donc semblables aux défauts induits par la courbure positive. De plus comme nous avons montré que les défauts sont uniformément répartis à la surface de la membrane (4.3.3), notre modèle de bicouche plate DOPC/DOG peut être utilisé à la place d’une membrane courbée pour étudier des peptides sensibles aux défauts de *packing* tel que le motif ALPS (voir Chapitres suivants) ; car la simulation d’une membrane plate nécessite moins de ressources de calcul que celle d’une membrane courbée.

4.4 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons montré que le DOG est localisé plus profondément dans la bicouche que le DOPC. Cette localisation a plusieurs conséquences : épaissement de

la bicouche, augmentation de la mobilité des têtes polaires et diminution de la mobilité des queues hydrophobes du DOPC, augmentation de l’hydratation de la région polaire de la bicouche et augmentation de la pression latérale au niveau des chaînes aliphatiques. Du point de vue des propriétés dynamiques de la bicouche, l’ajout du DOG n’affecte ni la diffusion latérale, ni la diffusion transversale du DOPC. En revanche, du point de vue des propriétés élastiques, la présence du DOG rend la bicouche moins rigide bien qu’elle ne soit pas plus compressible.

La caractérisation des défauts de *packing* montre que le nombre et la taille des défauts augmentent quand les chaînes aliphatiques saturées sont remplacées par des chaînes mono-insaturées ou quand le DOG est introduit dans la bicouche. Bien que le DOG augmente le nombre et la taille des défauts de *packing* à l’interface de la bicouche, il ne se co-localise pas avec les défauts. Les défauts sont uniformément répartis à la surface de la membrane. De manière intéressante, les défauts induits par le DOG sont semblables aux défauts induits par la courbure positive de la membrane (Cui *et al.*, 2011). Ainsi, nous montrons que notre modèle de bicouche plate DOPC/DOG permet de mimer les défauts de *packing* retrouvés dans le feuillet externe d’une membrane courbée.

Notre nouvelle approche pour caractériser et quantifier les défauts de *packing*, nous a permis de distinguer deux types de défauts de *packing* : les défauts chimiques (lorsque les chaînes aliphatiques sont visibles depuis la surface de la membrane, indépendamment de leur profondeur) et les défauts géométriques (lorsque les défauts sont localisés en dessous du niveau des glycérols). D’ailleurs, dans le Chapitre 5, nous montrons que les gros résidus hydrophobes du motif ALPS s’insèrent systématiquement dans des défauts géométriques.

5

Insertion du motif ALPS dans l'interface de la membrane

Le motif ALPS contient ~ 40 résidus et correspond à la région centrale de la protéine ArfGAP1 qui interagit avec la membrane (Bigay *et al.*, 2005). Ce motif est sensible aux défauts de *packing* entre les lipides car il se lie seulement sur des membranes courbées positivement ou sur des membranes plates enrichies en DOG.

Maintenant que les défauts de *packing* ont été caractérisés et quantifiés (voir chapitre précédent), nous allons nous intéresser dans ce chapitre à l'insertion du motif ALPS dans l'interface d'une membrane contenant de tels défauts. Une question fondamentale inaccessible aux expériences concerne les détails moléculaires de cette insertion. La DM apparait comme un outil de choix pour décrire un tel évènement à ce niveau de détail.

De manière générale, l'insertion d'un peptide interfacial peut être décomposée en deux étapes : i) l'insertion précoce (ou premiers évènements de l'insertion) correspondant à l'enfouissement des chaînes latérales hydrophobes dans les chaînes aliphatiques des lipides et ii) l'insertion complète lorsque l'ensemble du peptide s'est partitionné dans l'interface. Ces deux aspects seront abordés dans ce chapitre.

Précisément, nous allons examiner l'insertion du peptide ALPS-35 (correspondant au segment 197-231 dans la protéine ArfGAP1) dans l'interface d'une bicouche plate DOPC/DOG. Le peptide ALPS-35 a déjà été étudié par DM mais en partant du peptide

en hélice déjà inséré dans la membrane (Gonzalez-Rubio *et al.*, 2011). Dans toutes les simulations décrites dans ce chapitre, nous avons placé le peptide à l'extérieur de la membrane dans une conformation non structurée (en pelote ou étendue) afin de décrire en détail le mécanisme d'insertion (Figure 5.1).

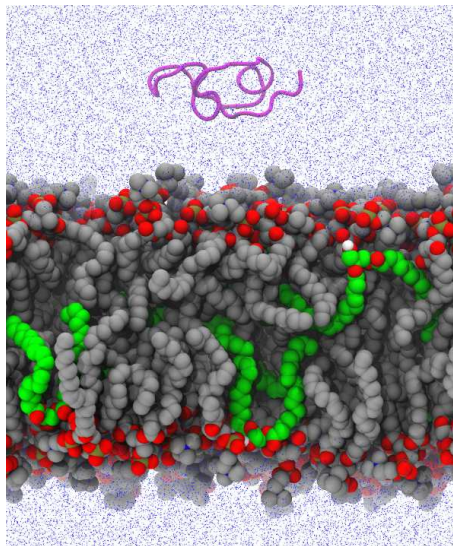


FIGURE 5.1 – Cliché de l'état initial du système. Le peptide est représenté en mauve, les DOPC et les DOG sont montrés respectivement en gris et en vert avec les atomes d'oxygène en rouge et l'eau en bleu.

Nous avons réalisé des simulations de DM à 300 K pour examiner l'insertion « précoce » correspondant à l'insertion des premiers résidus et des simulations à 333 K pour accélérer la cinétique et ainsi accéder plus rapidement à l'insertion complète du peptide (c'est-à-dire quand le squelette peptidique du peptide est en dessous des groupes phosphate).

5.1 LE PEPTIDE ALPS SE LIE AUX BICOUCHES DOPC/DOG VIA L'INSERTION DE GROS RÉSIDUS HYDROPHOBES

Nous définissons l'insertion d'un résidu comme une structure pour laquelle le centre de masse du résidu est en-dessous du niveau moyen des glycérols et réside à cet endroit pour au moins 1 ns.

L'insertion des gros résidus hydrophobes du peptide ALPS-35 (Figure 5.2) a été examinée à travers plusieurs simulations de DM comme illustré dans le Tableau 5.1.

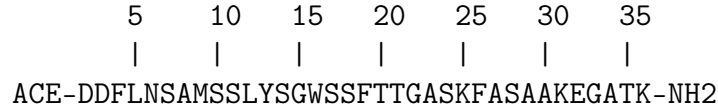


FIGURE 5.2 – Séquence du peptide ALPS-35. Les gros hydrophobes considérés sont F4, L5, M9, L12, F19 et F26.

Sim	Temp. (K)	Conf. initiale	Temps sim	Séquence de l'insertion (temps)
1	300	pelote	1 μ s	F26 (59 ns)
2	300	pelote	1 μ s	F26 (52 ns), F4 (437 ns)
3	300	pelote	400 ns	F26 (47 ns), F4 (218 ns)
4	300	pelote	400 ns	F26 (86 ns)
5	300	pelote	400 ns	L12 (103 ns)
6	333	pelote	2 μ s	L12 (40 ns), F4/F26/L5 (130 ns), M9 (500ns), F19 (800 ns)
7	333	étendue	1 μ s	L12 (6 ns), M9 (490 ns), F4/L5 (650 ns), F26 (810 ns)
8	333	étendue	1 μ s	F19 (30 ns), F4/F26/L5 (170 ns), L12 (370 ns/900 ns), M9 (370 ns)

Tableau 5.1 – Mécanisme d'insertion du motif ALPS-35 dans une bicouche DOPC/DOG. Seules les insertions des gros hydrophobes phénylalanine (F), leucine (L) et méthionine (M) sont considérées.

5.1.1 SIMULATIONS À 300 K

Cinq simulations du peptide ALPS-35 en présence d'une bicouche de DOPC/DOG ont été réalisées à 300 K avec la même conformation initiale (pelote) mais avec des vitesses initiales différentes pour augmenter les statistiques. Nous observons pour les cinq répliques, une première insertion dans les 100 premières ns et pour deux répliques sur cinq, une seconde insertion à 218 ns et 437 ns (Tableau 5.1). De plus, pour quatre répliques sur cinq le résidu F26 s'insère en premier et pour deux répliques sur cinq le résidu F4 s'insère en deuxième. Une représentation du système en fin de simulation est montrée dans la Figure 5.3.

Nous observons que l'adsorption du peptide ALPS-35 à la surface la membrane (*e.g.* premières interactions entre le peptide et la membrane) s'accompagne en premier de l'insertion du résidu F26 puis de l'insertion du résidu F4. S'agit-il d'un biais dû au manque d'échantillonnage ? Cette simulation ayant été calculée à 300 K, il est possible que le peptide n'ait pas suffisamment exploré de conformations différentes depuis sa conformation initiale avant d'atteindre la membrane. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé de nouvelles simulations à plus hautes températures pour augmenter l'échantillonnage.

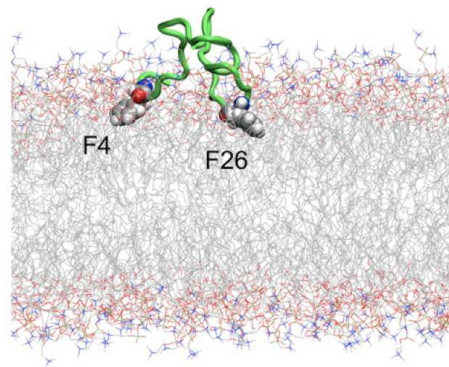


FIGURE 5.3 – Insertion de ALPS-35 à 300 K. Le peptide est montré en vert, les résidus insérés sont montrés en représentation van der Waals et les lipides sont représentés en gris avec les atomes d'oxygène en rouge, les atomes de phosphore en orange et les atomes d'azote en bleu.

5.1.2 SIMULATIONS À 333 K

Trois simulations du peptide ALPS-35 en présence d'une bicouche de DOPC/DOG ont été lancées à 333 K avec des conformations initiales différentes (en pelote et étendue). Comparée aux simulations à 300 K, ici la première insertion a lieu dans les 40 premières ns pour les trois répliques avec le résidu L12 ou le résidu F19. De plus, pour deux répliques sur trois, tous les gros hydrophobes sont insérés au bout d'1 μ s de simulation (Tableau 5.1 et Figure 5.4).

Comme attendu, nous observons plus d'évènements d'insertion en augmentant la température et pour deux simulations sur trois nous observons l'insertion de tous les gros hydrophobes. Comparé aux simulations à 300 K, le résidu qui s'insère en premier dans la membrane n'est pas le résidu F26 et la séquence des insertions est très variable, suggérant plutôt un processus stochastique et itératif. Enfin, comme pour les simulations à 300 K, l'insertion est irréversible (tout du moins à l'échelle de nos simulations) car une fois inséré le résidu ne se dissocie plus de la membrane.

Maintenant si on examine le partitionnement du peptide dans l'interface de la bicouche, partitionnement que nous définissons comme la première structure pour laquelle le centre de masse du peptide est en-dessous du niveau des groupes phosphate, on s'aperçoit que le centre de masse du peptide passe en dessous des atomes de phosphores après 800 ns pour les simulations 6 et 7 et après 200 ns pour la simulation 8 (Figure 5.5). Nos simulations à 333 K ont donc permis d'observer le partitionnement du peptide dans la bicouche sur une échelle de temps raisonnable (inférieur à la μ s). De plus, sur le temps de nos simulations une fois que le peptide est inséré il ne se dissocie plus de la bicouche.

Nous avons également examiné le rayon de giration du peptide au cours de son in-

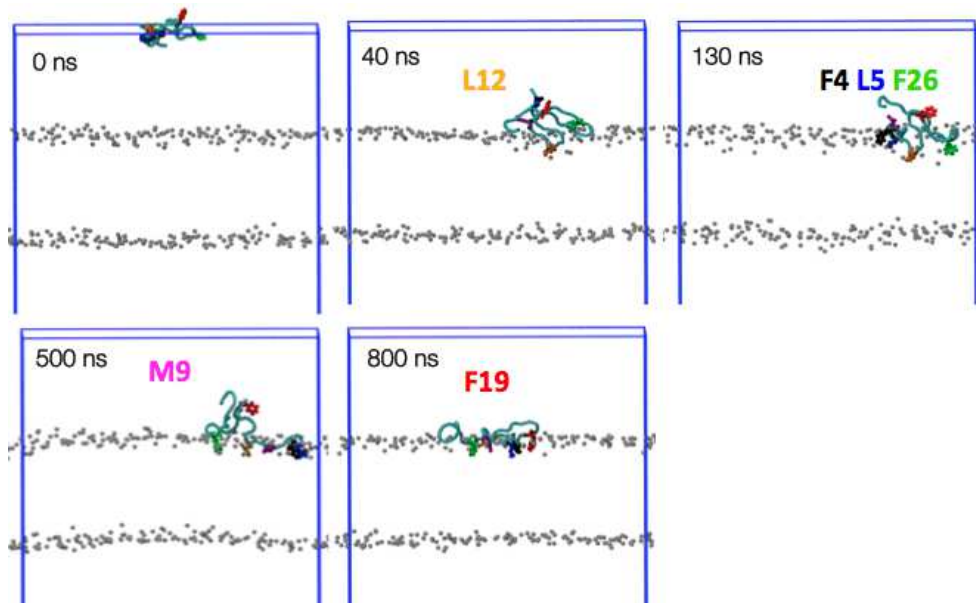


FIGURE 5.4 – Insertion de ALPS-35 à l'interface d'une bicouche DOPC/DOG à 333 K. Le peptide est montré en cyan, les gros hydrophobes L12, F4, L5, F26, M9 et F19 sont montrés respectivement en orange, noir, bleu, vert, rose et rouge et le niveau des glycérols est représenté par des sphères grises. Le reste du système a été masqué pour plus de clarté.

sersion dans la bicouche (Figure 5.6). Le rayon de giration traduit la compacité d'une molécule. Plus le rayon de giration est bas, plus la molécule est compacte et plus le rayon de giration est élevé, plus la molécule est étendue.

En début de simulation le rayon de giration est de 0,94 nm, 2,21 nm et 1,9 nm respectivement pour les simulations 6, 7 et 8 puis après 10 ns il diminue pour les simulations 7 et 8 (0,97 nm et 1,1 nm respectivement), suggérant que le peptide passe d'une conformation étendue à une conformation plus compacte dans les premières ns des simulations 7 et 8. Une fois que le peptide a atteint une conformation compacte, le rayon de giration augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur maximale autour de 760 ns pour les trois simulations. Cette observation suggère qu'une fois dans une conformation compacte, le peptide s'étend progressivement dans la surface de la bicouche pour faciliter l'insertion successive de ses résidus hydrophobes.

5.2 LES GROS RÉSIDUS HYDROPHOBES S'INSÈRENT DANS DES DÉFAUTS PRÉ-EXISTANTS

Lorsqu'on examine la localisation des défauts de *packing* après l'insertion de gros hydrophobes, on s'aperçoit que les grands défauts se co-localisent avec les résidus insérés (Vanni *et al.* (2013)), suggérant que c'est la chaîne latérale des résidus qui induit les

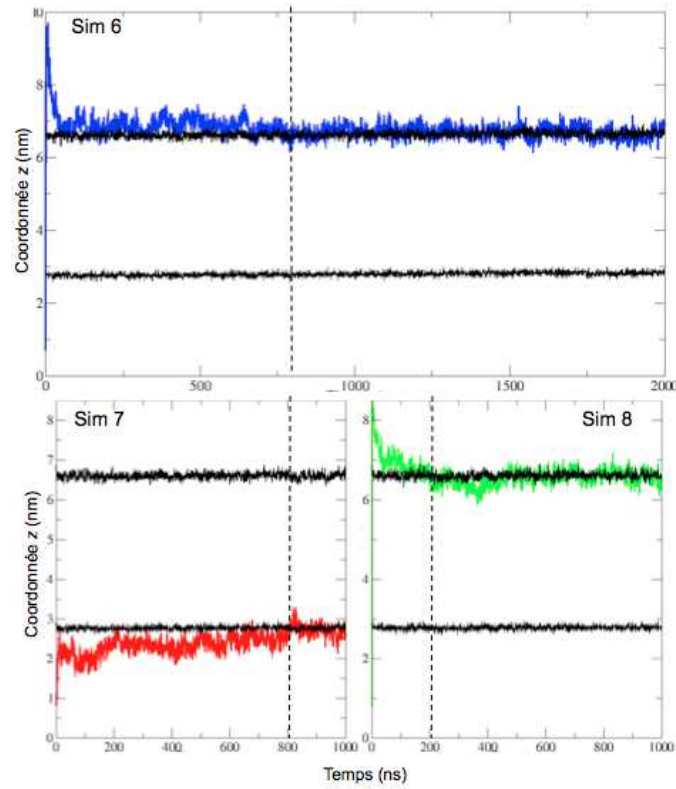


FIGURE 5.5 – Évolution de la coordonnée z du centre de masse de ALPS-35 (*backbone*) par rapport à la coordonnée z des phosphores à 333 K. En noir les phosphores, en bleu le peptide dans la simulation 6, en rouge le peptide dans la simulation 7 et en vert le peptide dans le simulation 8. Les lignes en pointillé indiquent le moment où le centre de masse du peptide passe en-dessous des phosphores.

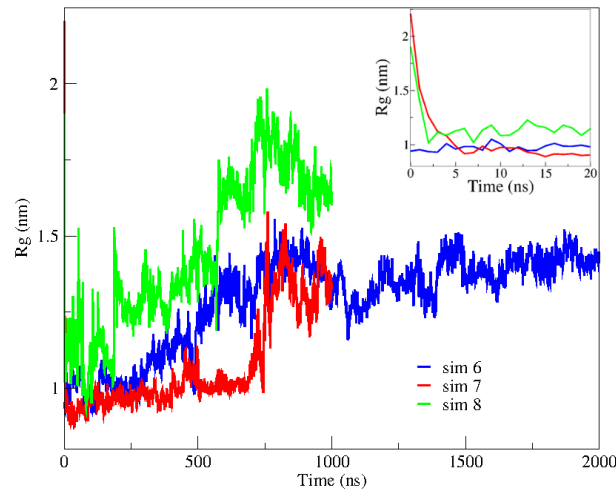


FIGURE 5.6 – Évolution du rayon de giration de ALPS-35 à 333 K. Le code couleur est le même que dans la Figure 5.5.

défauts ou au contraire que les grands défauts étaient déjà présents avant l'insertion. Pour trancher, nous avons suivi au cours du temps l'insertion des gros hydrophobes en

même temps que la taille des défauts de *packing* comme illustré dans la Figure 5.7.

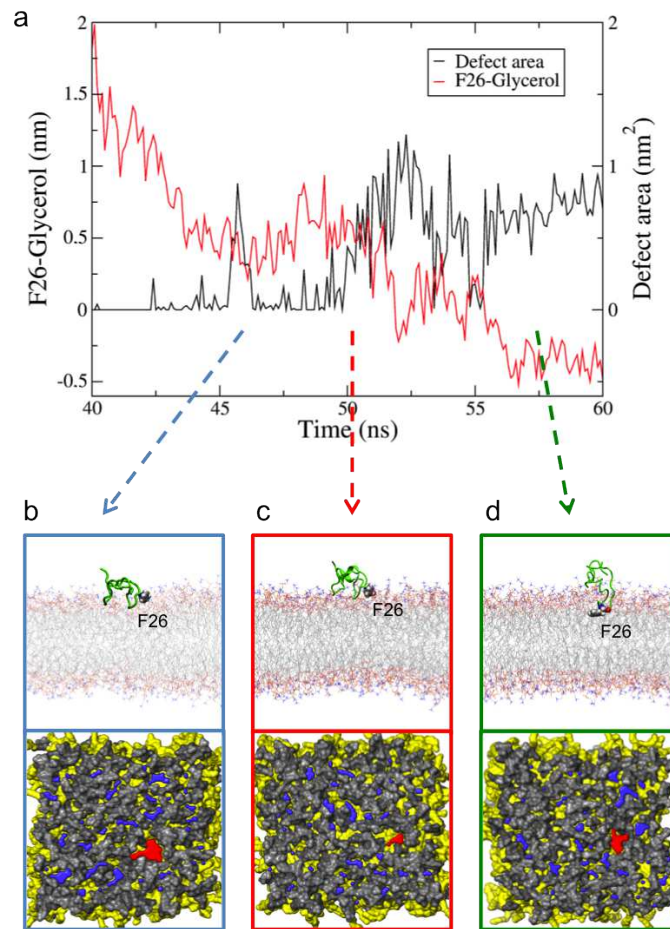


FIGURE 5.7 – Suivi de l'insertion de la F26 avec la formation d'un défaut de *packing*. (a) Évolution en fonction du temps de la distance le long de la normale entre le centre de masse de la F26 et le niveau moyen des glycérols (rouge) et de la taille du défaut de *packing* avec les mêmes coordonnées (x, y) dans le plan de la membrane que la F26 (noir). (b-d) Vue de côté du peptide et des lipides à proximité d'un défaut de *packing* à différents temps. Dans (b), pas d'insertion ; dans (c), le résidu est prêt à s'insérer en dessous du niveau des glycérols ; et dans (d) le résidu est entièrement inséré. La localisation des défauts de *packing* est montrée en dessous de chaque cliché. Le défaut qui est localisé à proximité de la F26 est montré en rouge (voir la légende de la Figure 4.9 pour le code couleur). Tiré de Vanni *et al.* (2013).

La courbe rouge représente la distance entre le centre de masse du résidu F26 et le niveau des glycérols, et la courbe noire correspond à la taille du défaut géométrique (Figure 4.9 d) qui a la même coordonnée (x, y) dans le plan de la membrane que le résidu F26. Le résidu F26 s'approche rapidement de la surface de la bicouche (entre ~ 4 ns et 46 ns il se déplace de 2 nm à 0,5 nm au dessus du niveau des glycérols). À ~ 46 ns un grand défaut de $0,9 \text{ nm}^2$ apparaît mais le résidu ne s'insère pas, puis le défaut disparaît. À ~ 50 ns un nouveau grand défaut se forme et le résidu commence à s'insérer, puis après

55 ns le résidu est complètement inséré jusqu'à la fin de la simulation. Nous avons réalisé la même analyse pour toutes les simulations et à chaque fois un défaut géométrique était déjà présent avant l'insertion (voir Tableau 1 de Vanni *et al.* (2013)).

5.3 L'INSERTION DU PEPTIDE ALPS INDUIT DES MODIFICATIONS MINIEURES SUR LES DÉFAUTS LIBRES

Comme nous avons vu précédemment que les gros hydrophobes s'insèrent dans des défauts pré-existants, nous avons ensuite examiné l'effet de l'insertion du peptide sur la distribution des défauts à distance du peptide (Figure 5.8).

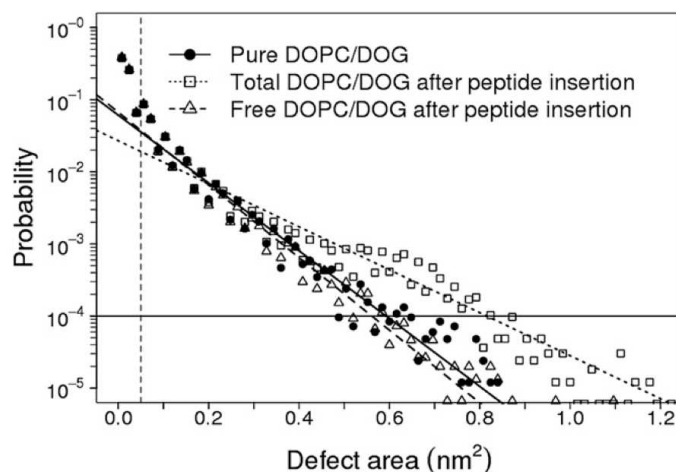


FIGURE 5.8 – Effet de l'insertion du peptide sur la distribution de la taille des défauts de *packing*. « Pure DOPC/DOG » représente les défauts dans une bicouche DOPC/DOG en absence de peptide, « Total DOPC/DOG after peptide insertion » représente les défauts dans une bicouche DOPC/DOG une fois le peptide inséré et « Free DOPC/DOG after peptide insertion » correspond aux défauts dans une bicouche DOPC/DOG mais en ayant supprimé les défauts occupés par le peptide. Tiré de Vanni *et al.* (2013).

Suite à l'insertion du résidu F26, les grands défauts sont plus nombreux comparés aux plus petits (carrés blancs). Toutefois, si on enlève les défauts qui sont occupés par le peptide (triangles blancs), la distribution de la taille des défauts est très similaire à celle dans une bicouche sans peptide (ronds noirs). Prises ensemble, ces observations suggèrent qu'une fois insérés dans la bicouche les résidus stabilisent les grands défauts dans lesquels ils se sont insérés sans affecter significativement les autres défauts présents dans la bicouche (les défauts libres).

5.4 LE MOTIF ALPS PRÉFÈRE LES BICOUCHES AVEC UNE PLUS GRANDE DENSITÉ DE DÉFAUTS

Sachant (voir la section 5.2) que les gros hydrophobes s'insèrent dans de grands défauts pré-existants, une membrane contenant moins de défauts devrait réduire l'insertion du peptide à l'interface de la membrane.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons simulé le peptide ALPS-35 en présence d'une bicouche de 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC) qui présente significativement moins de défauts de *packing* qu'une bicouche de DOPC/DOG (voir section 4.3.2). Comme pour les simulations de DM en présence d'une bicouche de DOPC/DOG, plusieurs simulations ont été lancées avec des graines initiales différentes (Tableau 5.2).

Sim	Bicouche	Temps sim	Séquence de l'insertion (temps)
1	DOPC/DOG	1 μ s	F26 (59 ns)
2	DOPC/DOG	1 μ s	F26 (52 ns), F4 (437 ns)
3	DOPC/DOG	400 ns	F26 (47 ns), F4 (218 ns)
4	DOPC/DOG	400 ns	F26 (86 ns)
5	DOPC/DOG	400 ns	L12 (103 ns)
1	DMPC	400 ns	F19 (196 ns)
2	DMPC	400 ns	-
3	DMPC	400 ns	-
4	DMPC	400 ns	F26 (133 ns)
5	DMPC	400 ns	F26 (218 ns)

Tableau 5.2 – Mécanisme d'insertion du motif ALPS-35 dans les bicouches DOPC/DOG et DMPC à 300 K. Seules les insertions des gros hydrophobes phénylalanine (F), leucine (L) et méthionine (M) sont considérées.

En présence d'une bicouche de DMPC, pour trois répliques sur cinq la première insertion se produit après 100 ns de simulation et pour deux répliques sur cinq aucune insertion n'a lieu sur les temps simulés (400 ns). De plus, si on compare le nombre total d'insertions dans les bicouches DOPC/DOG et DMPC sur les 400 premières ns, on obtient 3 insertions en DMPC contre 6 insertions en DOPC/DOG. Ce résultat montre qu'une bicouche contenant peu de défauts de *packing* comme une bicouche de DMPC ralentit et réduit l'insertion du peptide ALPS-35 à l'interface de la membrane.

Contrairement aux peptides plus classiques qui interagissent avec la membrane principalement à travers des interactions électrostatiques (comme les peptides antimicrobiens) le peptide ALPS interagit avec la membrane principalement à travers des interactions hydrophobes en raison de son manque de résidus chargés sur la face polaire. Les gros

résidus hydrophobes du motif ALPS sont donc le moteur de l’insertion. Le fait que l’insertion des résidus soit ralenti par une densité trop faible de défauts de *packing* dans la membrane peut donc expliquer en partie la hypersensibilité de ALPS aux défauts.

5.5 CONCLUSION

L’insertion du motif ALPS est guidée par l’insertion de ses gros résidus hydrophobes. À 300 K nous observons seulement l’insertion de deux résidus, alors qu’à 333 K (où l’échantillonnage est augmenté) nous observons l’insertion complète du peptide. Sur les temps de nos simulations (1 μ s) une fois que le peptide est inséré il ne se dissocie plus de la bicouche. De plus, pour faciliter l’insertion successive de ses résidus hydrophobes, le peptide s’étend progressivement dans l’interface.

Les gros résidus hydrophobes du motif ALPS s’insèrent dans des défauts pré-existants et cette insertion stabilise le défaut sans affecter les défauts distants du peptide. De plus, l’insertion des gros résidus hydrophobes est facilitée dans une bicouche contenant beaucoup de défauts de *packing* (DOPC/DOG) par comparaison à une bicouche en contenant peu comme une bicouche de DMPC.

Dans Vanni *et al.* (2013), pour améliorer les statistiques de la co-localisation entre l’insertion des gros hydrophobes et les défauts de *packing* pré-existants, nous avons simulé deux peptides minimaux du motif ALPS (SFLG et SLG) avec une bicouche de DOPC/DOG et une bicouche de DMPC. Pour les deux peptides, l’insertion du résidu central (en rouge) est facilitée dans une bicouche de DOPC/DOG par comparaison à une bicouche de DMPC et le résidu central s’insère à chaque fois dans un défaut pré-existant.

6

Repliement du motif ALPS dans l'interface de la membrane

Une fois inséré dans une membrane riche en défauts de *packing*, le motif ALPS adopte une conformation en hélice amphipathique (Bigay *et al.*, 2005). Son amphipaticité provient de l'espacement régulier de ses résidus hydrophobes tous les trois ou quatre résidus.

L'étape d'insertion du motif ALPS ayant été décrite au Chapitre 5, nous nous intéressons ici à l'étape suivante qui est son repliement en hélice dans l'interface. Cette étape de repliement est fondamentale dans le phénomène de reconnaissance des défauts de *packing*. En effet, une explication potentielle de sa sensibilité aux défauts pourrait provenir de son incapacité à se replier dans une membrane serrée, c'est-à-dire pauvre en défauts.

Dans un premier temps, il est important d'étudier les mécanismes moléculaires de ce repliement dans une membrane lâche, c'est-à-dire riche en défauts. À nouveau, la DM apparaît comme un outil de choix. Il est également essentiel d'avoir une validation expérimentale comme preuve absolue du repliement final, mais aussi pour guider les simulations. À cet effet, les peptides ALPS-35 et ALPS-23 (voir section 3.3.2) ont été examinés par des simulations de DM et par des expériences de CD.

6.1 REPLIEMENT DU PEPTIDE ALPS-35

6.1.1 EXPÉRIMENTALEMENT LE PEPTIDE ALPS-35 SE REPLIE EN HÉLICE SUR DE GRANDS LIPOSOMES ENRICHIS EN DOG

Comme le motif ALPS se structure en hélice- α à la surface de membranes courbées Bigay *et al.* (2005), nous avons vérifié qu'il était également capable de se replier en hélice à la surface d'une membrane plate enrichie en DOG. À cet effet, nous avons réalisé des expériences de CD en présence de grands liposomes (LUV) pour mimer une membrane plate et en présence de petits liposomes (SUV) pour mimer une membrane courbée, comme illustré dans la Figure 6.1.

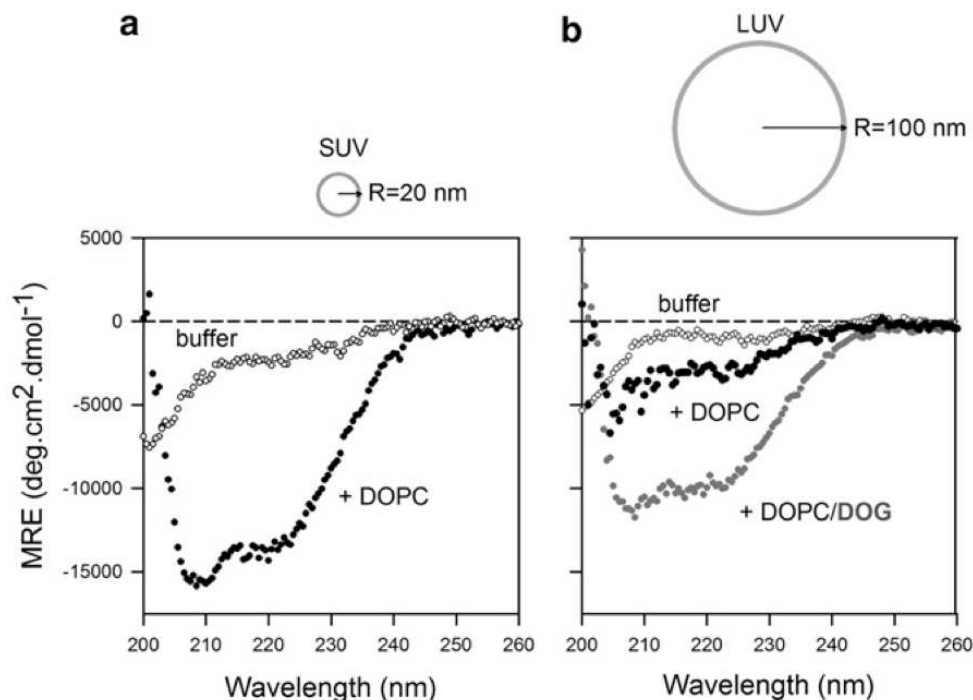


FIGURE 6.1 – Structure secondaire du motif ALPS-35 en présence de liposomes. (a) Spectres en solution (ronds blancs) et avec des petits liposomes (SUV) de DOPC (ronds noirs). (b) Spectres en solution (ronds blancs), avec des grands liposomes (LUV) de DOPC (ronds noirs) et de DOPC/DOG (ronds gris). Tiré de Vanni *et al.* (2013).

Comme attendu, le peptide n'est pas structuré en solution (ronds blancs) et se replie en hélice (spectre caractéristique avec deux minima à 208 nm et 222 nm) en présence de petits liposomes de DOPC (ronds noirs). En présence de grands liposomes, le peptide se replie en hélice lorsque les liposomes contiennent du DOG (ronds noirs) et reste non structuré en solution et en absence de DOG (ronds gris). Ce résultat montre que le peptide ALPS-35 est capable de se replier en hélice à la fois sur une membrane courbée et sur une

membrane plate enrichie en DOG. Le pourcentage d'hélice (voir matériels et méthodes) dans ces deux conditions est respectivement 38% et 29%. Nous pouvons donc maintenant envisager de simuler par DM le repliement du peptide ALPS à la surface d'une membrane plate enrichie en DOG.

6.1.2 LE PEPTIDE ALPS-35 NE SE REPLIE PAS EN HÉLICE À 333 K PAR SIMULATION DE DM (À L'ÉCHELLE DE LA μ S)

Le repliement d'un peptide à la surface d'une membrane est un vrai défi en DM car il nécessite de très longues simulations pour échantillonner suffisamment l'espace conformationnel. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé la même stratégie que dans Ulmschneider *et al.* (2010) qui consiste à augmenter la température pour faciliter le passage des barrières d'énergie et ainsi accélérer l'échantillonnage. En simulant le peptide modèle transmembranaire (WALP) à haute température (80 °C), Ulmschneider *et al.* ont réussi à observer le repliement en hélice du peptide dans la membrane en moins d'1 μ s. De plus, ils montrent par des expériences de CD que le peptide est remarquablement thermostable car il reste en hélice à haute température.

La Figure 6.2 montre l'évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-35 au cours de trois simulations à 333 K évaluée avec le programme DSSP (voir Tableau 5.1 pour les conditions initiales).

La simulation 8 est celle qui présente le plus grand pourcentage d'hélicité (7 % contre 1 % pour les simulations 6 et 7) qui est bien loin des 29 % estimés expérimentalement par CD (voir section 6.1.1). La simulation 8 montre un fragment d'hélice en C-terminale (C-ter) du peptide à partir de 200 ns mais qui disparaît progressivement à partir de 800 ns. La simulation 7 montre un petit fragment d'hélice en C-ter à partir de 800 ns mais qui disparaît après 900 ns. Dans la simulation 6, le peptide semble piégé en feuillet- β (en rouge) en début de simulation et forme un petit fragment d'hélice en N-ter entre 100 et 200 ns.

Prises ensembles ces observations suggèrent soit que le peptide n'est pas thermostable, soit que le champ de forces utilisé (combinaison OPLS-AA / Berger) n'est pas capable de former et de stabiliser l'hélice. Cependant, comme nous avons utilisé le même champ de forces que dans Ulmschneider *et al.* (2010), nous avons dans un premier temps vérifié la thermostabilité du peptide.

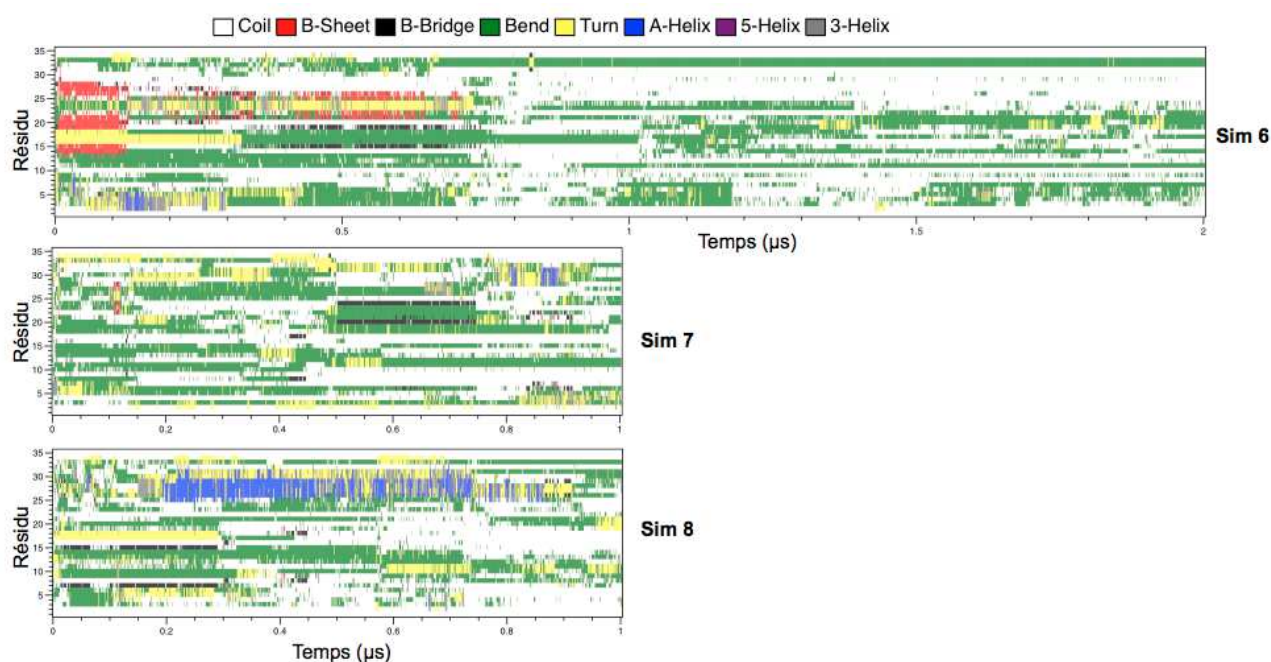


FIGURE 6.2 – Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-35 au cours des simulations à 333 K. En haut la simulation 6, au milieu la simulation 7 et en bas la simulation 8 (voir Tableau 5.1). En blanc les conformations non-structurées, en rouge les feuillets- β beta, en noir les brins- β , en vert et en jaune les coudes, en jaune les rotations locales, en bleu les hélices- α , en mauve les hélices 5-10 et en gris les hélices 3-10.

6.1.3 LE PEPTIDE ALPS-35 N'EST PAS THERMOSTABLE

PAR DM

Pour vérifier la thermostabilité du peptide par DM, nous avons réalisé deux simulations d'1 μ s à 333 K en partant du peptide en hélice- α et inséré dans l'interface de la membrane.

L'évolution de la structure secondaire du peptide au cours des deux simulations (évaluée avec le programme DSSP) est montrée dans la Figure 6.3.

Nous observons, pour les deux simulations, une disparition progressive de l'hélice- α (en bleu) au centre et en N-ter du peptide tandis que l'extrémité C-ter semble plus stable. Au vu de ce résultat nous suggérons que le peptide ALPS-35 n'est pas thermostable. Toutefois, pour vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de tester la thermostabilité du peptide par des expériences de CD.

PAR CD

Pour vérifier la thermostabilité du peptide par CD, nous avons réalisé des mesures à différentes températures comme illustré dans la Figure 6.4.

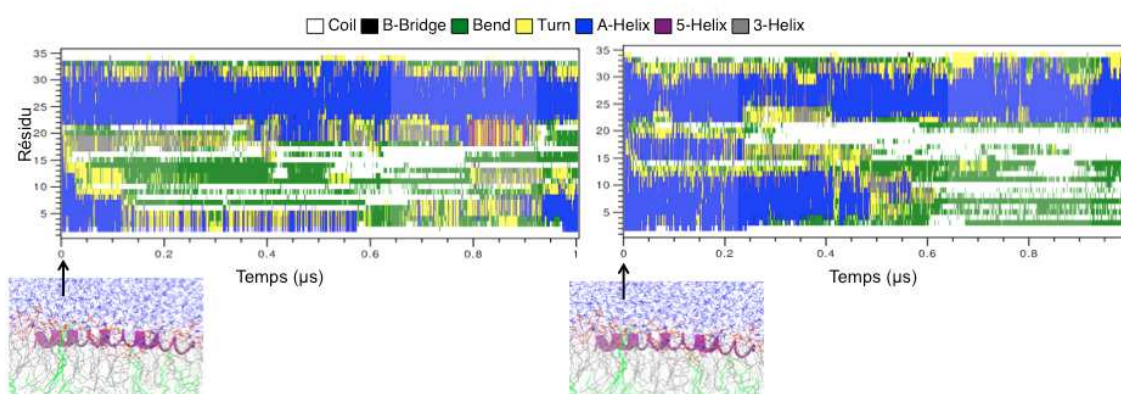


FIGURE 6.3 – Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-35 à 333 K (en partant du peptide en hélice- α et inséré dans l'interface de la membrane). Le code couleur est le même que dans la Figure 6.2). En dessous, le cliché du système en début de simulation (en mauve le peptide, en gris les DOPC, en vert les DOG et en bleu les molécules d'eau).

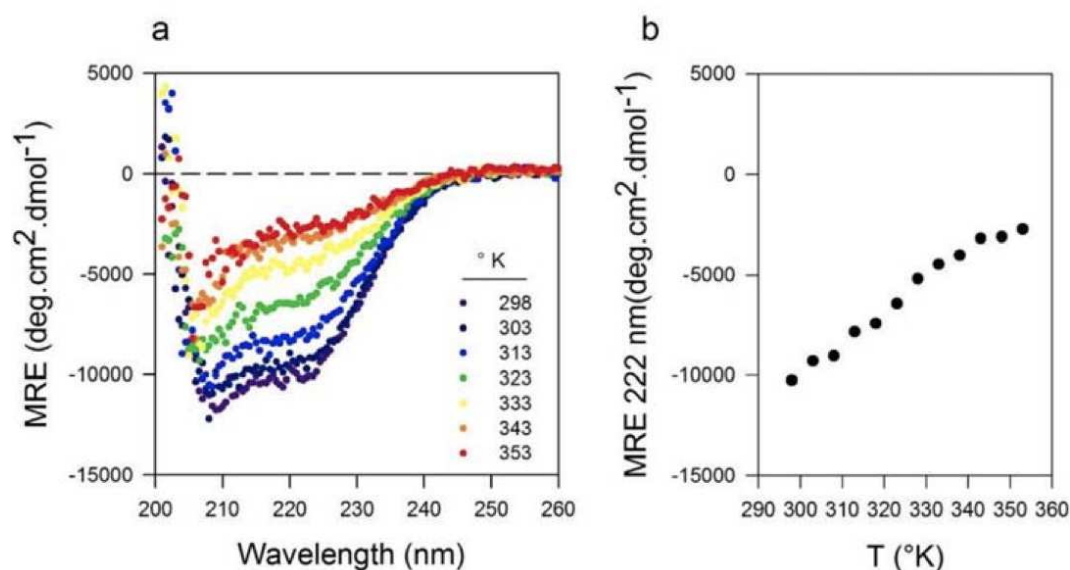


FIGURE 6.4 – Effet de la température sur la structure secondaire du peptide ALPS-35. (a) Ellipticité en fonction de la longueur d'onde. (b) Ellipticité à 222 nm en fonction de la température. Tiré de (Vanni *et al.*, 2013).

L'augmentation de la température entraîne la disparition progressive des minima à 208 nm et 222 nm caractéristiques de l'hélice. Le pourcentage d'hélicité (voir matériels et méthodes) passe de 29 % à 298 K à 8 % à 333 K. Cela donne une température de fusion T_m d'environ 325 K (où on a 50 % du peptide replié en hélice et 50 % non structuré). Ce résultat montre que le peptide ALPS-35 n'est pas thermostable et que les simulations de DM sont en accord avec le CD.

Le Tableau 6.1 résume les pourcentages d'hélicité du peptide ALPS-35 estimés à partir des expériences de CD et des simulations de DM.

Technique	Temp. (K)	Système	Hélicité (%)
CD	298	SUV DOPC	38 %
CD	298	LUV DOPC/DOG	29 %
CD	333	LUV DOPC/DOG	8 %
Simulations DM	333	Bicouche DOPC/DOG	7 % et 1 %

Tableau 6.1 – Hélicité du peptide ALPS-35 estimée à partir des expériences de CD et des simulations de DM (avec DSSP).

Bien qu'utiles pour observer les étapes d'insertion, nos simulations à 333 K ne peuvent pas être utilisées pour étudier le repliement comme dans Ulmschneider *et al.* (2010).

Nous nous sommes donc dirigés vers la méthode REMD qui permet d'accélérer l'échantillonnage tout en simulant le système (peptide + bicouche + solvant) à température physiologique. De plus, Nymeyer *et al.* (2005) ont montré que cette méthode permettait de replier en hélice le peptide synthétique WALP-16 dans une bicouche de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DPPC).

Brièvement, le REMD consiste à simuler plusieurs répliques du système à différentes températures et à échanger les répliques voisines durant la simulation à l'aide d'un critère d'énergie. Comme les répliques à haute température franchissent plus facilement les barrières d'énergie et que les répliques diffusent dans les différentes températures, les conformations de basse énergie sont échantillonnées efficacement.

Bien qu'efficace pour accéder plus rapidement au repliement d'un peptide, le REMD présente une limitation qui est la taille du système. En effet, plus le système est grand, plus le nombre de répliques est important. Pour contourner ce problème, nous avons décidé de raccourcir la séquence du motif ALPS afin de réduire le nombre de lipides et de molécule d'eau. Ainsi, en passant du peptide ALPS-35 (35 résidus) au peptide ALPS-23 (23 résidus), le nombre de répliques nécessaires passe de 100 à 42.

6.2 REPLIEMENT DU PEPTIDE ALPS-23

6.2.1 EXPÉRIMENTALEMENT LE PEPTIDE ALPS-23 SE REPLIE EN HÉLICE À LA SURFACE DE GRANDS LIPOSOMES ENRICHIS EN DOG

Maintenant que nous avons raccourci la séquence du motif ALPS, nous avons dans un premier temps vérifié que le peptide ALPS-23 était toujours sensible aux défauts de

packing entre les lipides. À cet effet, nous avons vérifié par CD sa structure secondaire en présence de grands liposomes de DOPC/DOG (pour mimer une membrane plate contenant des défauts de *packing*) et de petits liposomes de DOPC/DOG (pour mimer une membrane courbée avec des défauts encore plus importants). Les résultats sont montrés dans la Figure 6.5.

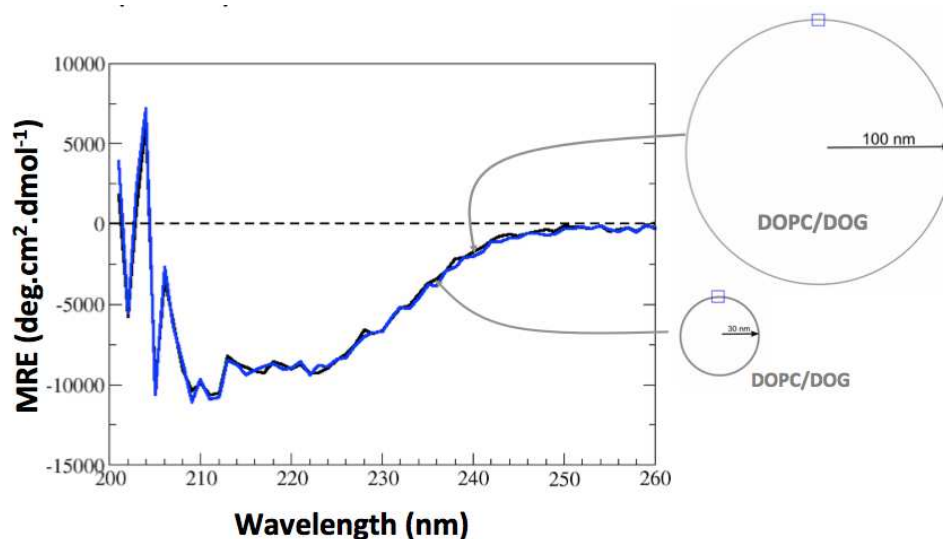


FIGURE 6.5 – Structure secondaire du motif ALPS-23 en présence de liposomes. En noir avec de grands liposomes de DOPC/DOG et en bleu avec de petits liposomes de DOPC/DOG.

À la fois avec de petits et de grands liposomes contenant du DOG, le peptide se replie en hélice (deux minima à 208 nm et 222 nm). Le pourcentage d'hélicité dans ces deux conditions est respectivement 27 % et 25 %. Donc, au même titre que le peptide ALPS-35, le peptide ALPS-23 se replie en hélice sur des grands liposomes enrichis en DOG. Bien que plus petit, le peptide ALPS-23 est toujours sensible aux défauts de *packing* entre les lipides, car en présence de liposomes pauvres en défauts de *packing* il ne se replie plus en hélice (données non montrées).

Contrairement au peptide ALPS-35, que ce soit avec de grands ou de petits liposomes de DOPC/DOG les pourcentages d'hélicité du peptide ALPS-23 sont très proches, suggérant que l'ajout du DOG dans une membrane courbée ne crée pas plus de défauts. Toutefois pour s'en assurer, il faudrait répéter plusieurs fois l'expérience et faire l'expérience avec de petits liposomes de DOPC.

6.2.2 LE PEPTIDE ALPS-23 NE SE REPLIE PAS EN HÉLICE AVEC LE REMD

Les simulations de REMD ont été réalisées avec 42 répliques espacées de 300 K à 400 K (tentative d'échange toutes les 2 ps). L'espacement entre les répliques a été choisi

de manière à avoir un pourcentage d'échange de 30 % en utilisant le prédicteur de température de Patriksson et van der Spoel (2008). Chaque réplique a été lancée sur de 200 ns, représentant une longueur totale de 8,4 μ s.

Dans ce travail, nous nous concentrons sur la réplique à 300 K car nous avons montré précédemment que le peptide n'est pas thermostable. On rappelle que la simulation n'est pas continue sur une même température en raison des échanges entre les répliques. Par contre, on peut regarder le comportement d'ensemble (pour faire des moyennes) à une température donnée.

Comme pour les simulations à 333 K (voir section 6.1.2), le peptide a été placé au départ de la simulation à l'extérieur de la bicouche dans une conformation non structurée. L'évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-23 (évaluée avec le programme DSSP) à 300 K est montrée dans la Figure 6.6.

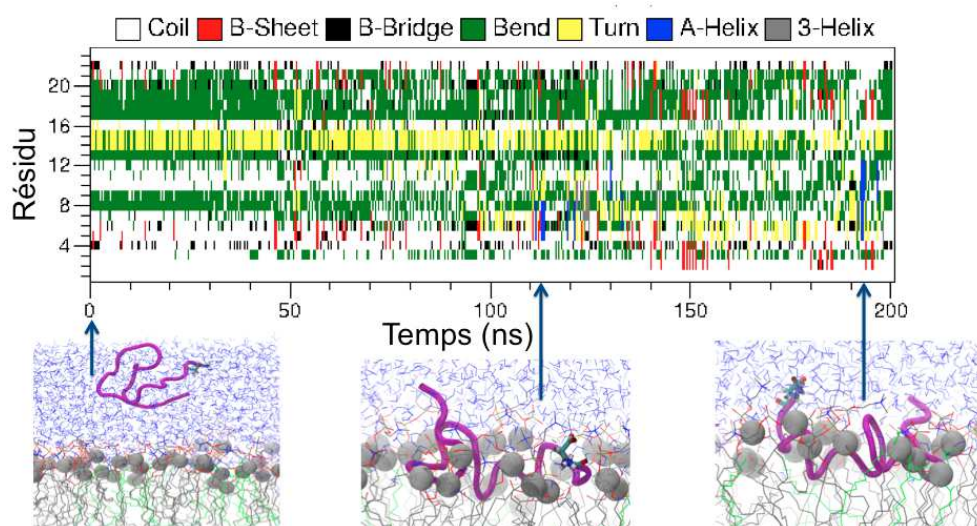


FIGURE 6.6 – Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-23 par REMD En haut, le tapis de structure secondaire de la réplique à 300 K (le code couleur est le même que dans la Figure 6.2). En dessous, des clichés du système à différents temps (en mauve le peptide, en sphères grises l'atome central des glycérols, en gris les DOPC, en vert les DOG et en bleu les molécules d'eau).

Seuls quelques fragments d'hélice sont observés en N-ter du peptide, correspondant à un pourcentage d'hélicité de seulement 1 %. Ce résultat montre que le REMD n'a pas permis de replier en hélice le peptide ALPS-23 sur l'échelle de nos simulations.

Si on examine l'évolution au cours du temps de la distance en z du peptide (en prenant le centre de masse du squelette peptidique) par rapport au niveau des phosphores (Figure 6.7), on s'aperçoit que le peptide interagit avec les deux feuillets de la bicouche, car le peptide ne s'insère pas forcément du même côté dans toutes les répliques. De plus, l'insertion complète du peptide semble se produire au environ de 125 ns, ce qui représente

plus de la moitié de la simulation.

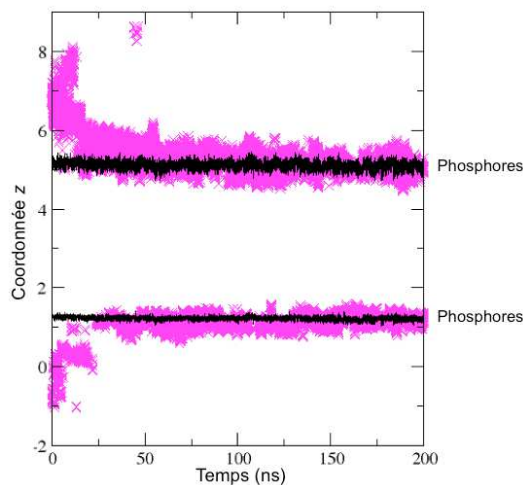


FIGURE 6.7 – Évolution de la coordonnée z du centre de masse de ALPS-23 (*backbone*) par rapport à la coordonnée z des phosphores au cours du temps dans la réplique à 300 K. En noir les phosphores et en rose le peptide.

Du point de vu des énergies, l'énergie peptide-eau est plus basse que l'énergie peptide-lipides en début de simulation (car le peptide est au départ dans l'eau), puis progressivement ces deux énergies convergent vers la même valeur à ~ 125 ns (Figure 6.8 a). De manière intéressante, à ~ 125 ns les fluctuations de l'énergie peptide-peptide augmentent (Figure 6.8 a). Prises ensembles, ces observations suggèrent qu'une fois inséré dans l'interface membrane/eau, le peptide explore plus de conformations. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons examiné le rayon de giration du peptide au cours de la simulation comme illustré dans la Figure 6.8 b.

Comme attendu, à environ 125 ns le rayon de giration oscille entre des grandes et des petites valeurs, montrant que le peptide explore à la fois des conformations compactes (rayon de giration bas) et des conformations étendues (rayon de giration élevé). Le rayon de giration nous indique qu'au départ de la simulation le peptide est dans une conformation compacte puis au fur et à mesure qu'il s'insère dans la bicouche il explore des conformations de plus en plus étendues. Les conformations explorées par le peptide après 125 ns de simulation sont montrées dans la Figure 6.9.

Le peptide adopte à la fois des conformations compactes et étendues avec une préférence pour les conformations compactes (39 % contre 37 %). De plus, les temps de simulations en dessous des clichés de la Figure 6.9 nous indique que le peptide alterne entre une conformation compacte et une conformation étendue. Si on considère que le peptide passe par une conformation étendue avant de se replier en hélice, il faudrait étendre cette simulation sur des temps beaucoup plus longs pour explorer d'avantage les conformations étendues. Toutefois, comme une simulation de REMD nécessite des res-

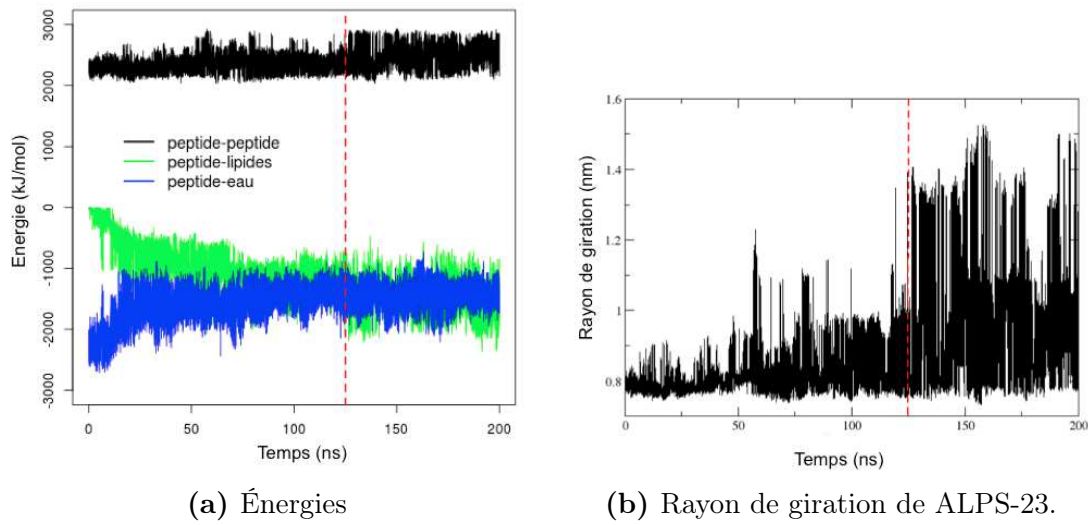


FIGURE 6.8 – Évolution des énergies (peptide-peptide, peptide-lipides et peptide-eau) et du rayon de giration au cours du temps dans la réplique à 300 K. La ligne rouge en pointillés indique le moment les énergies peptide-eau et peptide-lipides convergent et le moment où le rayon de giration fluctue entre des grandes et des petites valeurs.

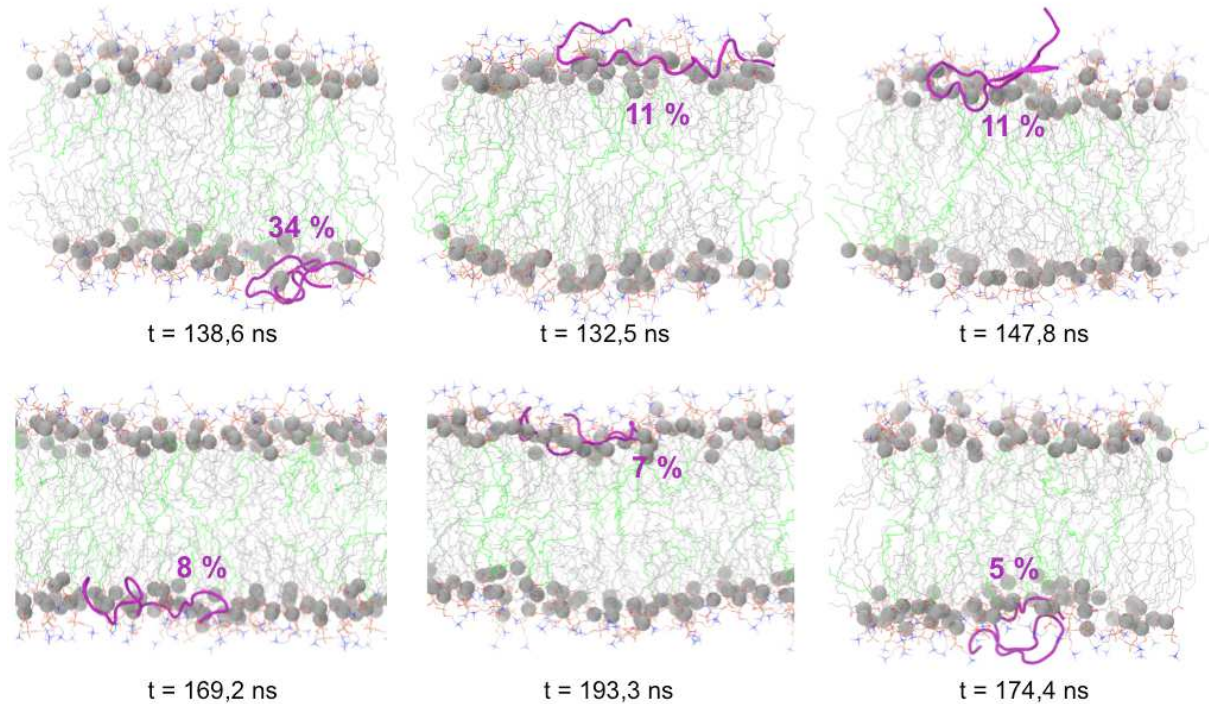


FIGURE 6.9 – *Clustering* des conformations du peptide ALPS-23 dans la réplique à 300 K après 125 ns de simulation. Basé sur le RMSD avec un *cutoff* de 0,3 nm.

sources de calculs importantes (ici ~ 50000 heures CPU¹), nous avons décidé de ne pas

1. Nombre d'heures que prendrait le calcul si on l'avait lancé sur 1 seul processeur.

étendre la simulation. À la place, nous avons choisi de lancer une nouvelle simulation de REMD en partant du peptide entièrement replié en hélice- α et inséré dans l'interface de la bicouche. Le but ici étant de vérifier si le pourcentage d'hélice converge vers la valeur obtenue que nous avons obtenue en CD (25 %). L'évolution de la structure secondaire du peptide à 300 K (évaluée avec le programme DSSP) est montrée dans la Figure 6.10.

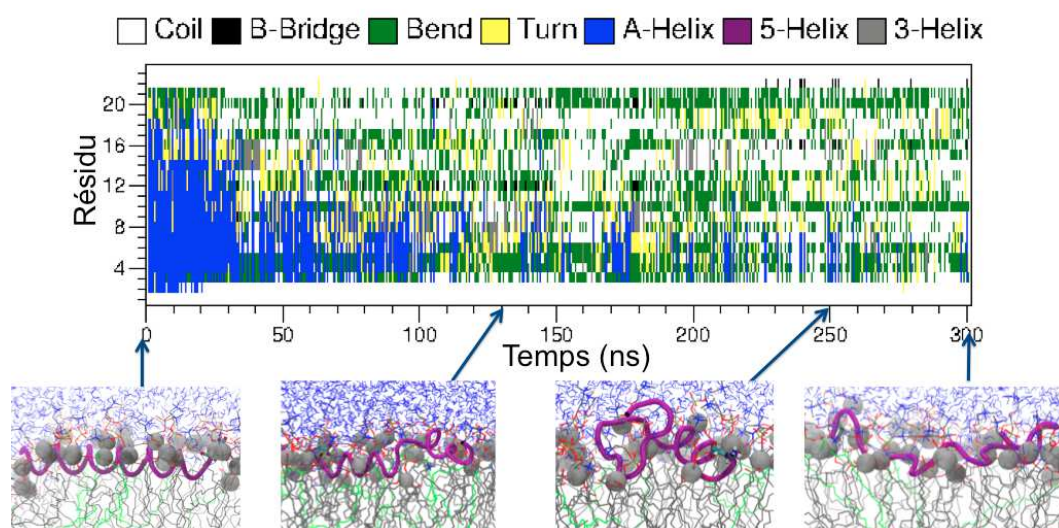


FIGURE 6.10 – Évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-23 par REMD (peptide en hélice et inséré). En haut, le tapis de structure secondaire de la réplique à 300 K (le code couleur est le même que dans la Figure 6.2). En dessous, des clichés du système à différents temps (en mauve le peptide, en sphères grises l'atome central des glycérols, en gris les DOPC, en vert les DOG et en bleu les molécules d'eau).

Le tapis de structure secondaire montre une disparition progressive de l'hélice- α en N-ter du peptide et une disparition complète de l'hélice- α en C-ter. Au vu de ce résultat, nous avons décidé d'estimer le pourcentage d'hélicité avec une méthode supplémentaire pour s'assurer que le résultat n'était pas dû à la méthode DSSP. À cet effet nous avons utilisé la méthode des blocs protéiques (voir matériels et méthodes). Les résultats sont résumés dans le Tableau 6.2.

Avec les deux méthodes, nous observons une diminution brutale de l'hélicité après les 100 premières ns, puis une diminution progressive jusqu'à la fin de la simulation. L'hélicité dans les 100 dernières ns est 6 % avec le programme DSSP et 15 % avec les blocs protéiques. Bien que l'hélicité soit plus importante avec les blocs protéiques, elle est bien en dessous des 25 % observés expérimentalement. Ce résultat montre que notre simulation de REMD n'a pas permis de stabiliser l'hélice du peptide ALPS-23.

Au vu de ces observations, nous pensons qu'il y a peut-être un problème avec le champ de forces OPLS-AA (utilisé pour décrire le peptide) car une récente étude montre que le champs de forces OPLS-AA échoue pour reproduire les données expérimentales

Méthode	Temps (ns)	Hélicité (%)
DSSP	0-100	35 %
	100-200	10 %
	200-300	6 %
Blocs protéiques	0-100	44 %
	100-200	22 %
	200-300	15 %

Tableau 6.2 – Hélicité du peptide ALPS-23 estimée à partir de la réplique à 300 K (avec DSSP et les blocs protéiques).

Andersson *et al.* (2013). Les auteurs montrent, avec une simulation de 17 μ s lancée à 300 K sur le supercalculateur Anton, que la mélittine (peptide interfacial de 26 résidus) se replie en hélice à la surface d'une bicouche de DOPC avec le champ de forces CHARMM mais pas avec le champ de forces OPLS-AA.

6.3 CONCLUSION

Le peptide ALPS-35 se replie en hélice à la fois avec des petits liposomes de DOPC et des grands liposomes de DOPC/DOG. Bien que le pourcentage d'hélicité soit moins important avec des grands liposomes de DOPC/DOG (29 % contre 38 % avec des petits liposomes de DOPC), l'ajout du DOG dans les grands liposomes favorise le repliement en hélice du peptide ALPS-35.

Avec nos simulations à 333 K, nous n'avons pas réussi à replier en hélice le peptide ALPS-35. Comme les expériences de CD montrent que le peptide ALPS-35 n'est pas thermostable, nous nous sommes dirigés vers la méthode de REMD qui permet d'augmenter l'échantillonnage tout en explorant des conformations à température ambiante. Pour diminuer le nombre de répliques nécessaires pour réaliser une simulation de REMD, nous avons raccourci la séquence du peptide ALPS-35. Nous montrons expérimentalement que le peptide ALPS-23 est toujours sensible aux défauts de *packing* car il se replie en hélice avec de grands liposomes de DOPC/DOG comme le peptide ALPS-35. Néanmoins, même avec notre simulation de REMD nous n'avons pas réussi à replier en hélice le peptide ALPS-23. L'insertion complète du peptide dans la membrane semble se produire au environ de 125 ns et ce n'est qu'une fois inséré qu'il commence à explorer des conformations plus étendues.

Une nouvelle simulation de REMD en partant du peptide entièrement replié en hélice- α et inséré dans l'interface de la bicouche montre une disparition progressive de l'hélice en N-ter du peptide et une disparition complète en C-ter. Cette disparition de l'hélice est

confirmée par deux méthodes permettant d'évaluer la structure secondaire (DSSP et les blocs protéiques). Au vu de ces observations nous en concluons que la différence d'hélicité entre les expériences de CD et les simulations provient du champ de forces utilisé.

7

Énergie libre de partitionnement du motif ALPS dans la membrane

La capacité du motif ALPS à sentir les défauts de *packing* entre les lipides passe par sa liaison ou non à la membrane. Il est donc essentiel de comprendre quelles sont les caractéristiques pouvant moduler cette liaison.

Dans ce chapitre, notre but était de quantifier l'affinité de ALPS pour des membranes de courbure et de composition lipidique différentes. Les simulations tout-atome ne permettent pas d'accéder à ce type de quantification de manière triviale. Néanmoins, nos expériences de CD nous ont permis de mesurer l'affinité de liaison dans un certain nombre de conditions.

Pour cela, nous avons utilisé la stratégie générale de White *et al.* (1998) qui s'applique à des hélices amphipathiques interfaciales. Le système est décrit en tant que cycle thermodynamique à trois états (**A**, **B**, **C**) comme illustré dans la Figure 7.1. Expérimentalement, on mesure directement l'énergie libre de passage du peptide non structuré dans l'eau au peptide replié en hélice dans l'interface (ΔG_{AC}). D'après White, ce processus se décompose en deux sous étapes : i) partitionnement du peptide en conformation non structurée dans la membrane (de **A** vers **B**) puis ii) repliement du peptide en hélice (de **B** vers **C**). White nomme ce phénomène **couplage partitionnement/repliement** car l'état **B** est transitoire et migrera inexorablement vers l'état C. L'état B n'est donc pas

accessible de manière triviale au niveau expérimental; White propose d'évaluer ΔG_{AB} par l'utilisation d'une échelle de partitionnement eau/membrane pour chaque acide aminé (White et Wimley, 1998; Wimley et White, 1996).

De manière intéressante, cette stratégie permet d'évaluer l'énergie libre de repliement du peptide dans l'interface (ΔG_{BC}) en complétant le cycle thermodynamique.

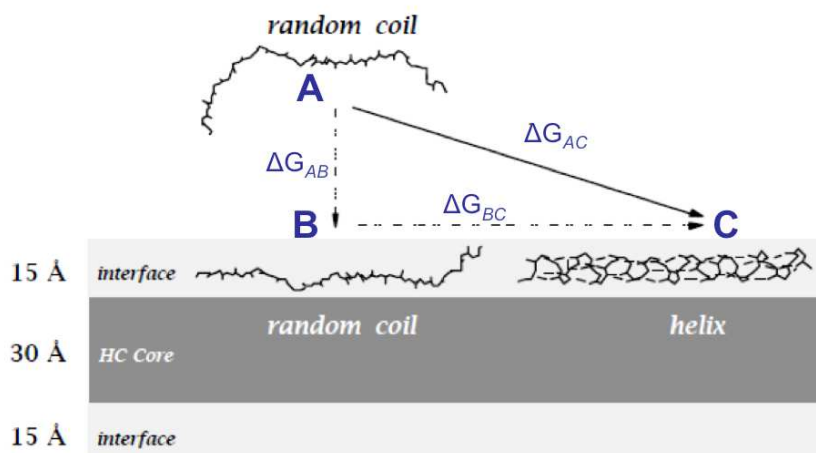


FIGURE 7.1 – Principe général de liaison d'un peptide interfacial dans la membrane. **A** représente le peptide non structuré dans l'eau, **B** représente le peptide non structuré dans l'interface et **C** représente le peptide replié en hélice dans l'interface. L'étape de **A** vers **C** correspond au partitionnement de l'hélice dans l'interface de la membrane. Elle peut-être décomposée en deux sous étapes : **A** vers **B** correspond au partitionnement du peptide non structuré dans la membrane et **B** vers **C** correspond au repliement du peptide dans l'interface. Tiré de White *et al.* (1998).

Ici, nous avons calculé le ΔG_{AC} des peptides ALPS-35 et ALPS-23 à partir des expériences de CD. Pour le peptide ALPS-35 nous avons utilisé des petits liposomes (SUV) de DOPC/DOG et pour le peptide ALPS-23 nous avons utilisé des SUV de trois compositions lipidiques différentes (POPC, DOPC et DOPC/DOG). Nous n'avons pas pu faire la mesure avec de grands liposomes (LUV) car les spectres étaient trop bruités à cause des LUV qui diffusent la lumière de manière trop importante (pour compenser l'absorbance trop forte du signal par l'échantillon, le voltage du photomultiplicateur qui transforme le signal lumineux en signal électronique est augmenté, et ceci augmente le bruit).

À noter que, contrairement au reste du manuscrit, dans ce chapitre nous utiliserons l'unité kcal/mol au lieu de kJ/mol ($1 \text{ kcal/mol} = 4,184 \text{ kJ/mol}$). Cette unité est régulièrement utilisée dans la littérature expérimentale.

7.1 ÉNERGIE LIBRE DE PARTITIONNEMENT EN HÉLICE DU MOTIF ALPS DANS LA MEMBRANE

7.1.1 LE PEPTIDE ALPS-35

La Figure 7.2 montre l'évolution de la structure secondaire du peptide ALPS-35 en présence d'une concentration croissante de SUV de DOPC.

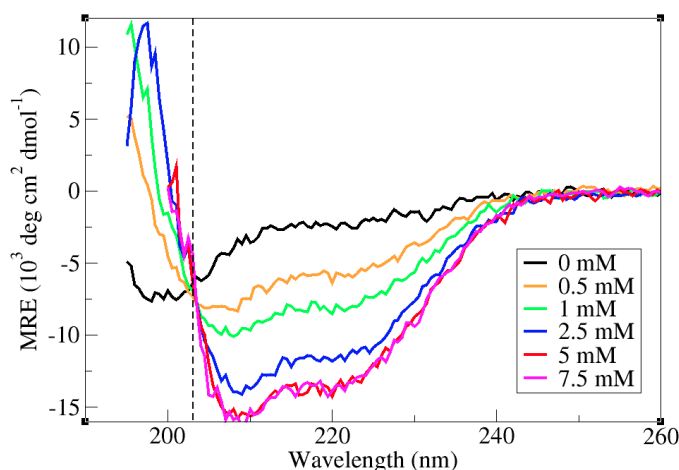


FIGURE 7.2 – Couplage partitionnement-repliement du peptide ALPS-35 dans la membrane de DOPC. Titration avec des SUV. Le point isodichroïque à 203 nm (ligne en pointillés) indique que le peptide possède deux états principaux : non structuré en solution et replié en hélice dans la membrane.

Comme attendu, le peptide est non structuré en solution et adopte une hélice (minima caractéristiques à 208 et 222 nm) qui augmente progressivement avec la quantité de liposomes. Le point isodichroïque à 203 nm (ligne en pointillés) indique l'existence de seulement deux états : non structuré en solution et replié en hélice dans la membrane.

À partir de l'ellipticité molaire (MRE) à 222 nm, nous avons calculé l'énergie libre de partitionnement en hélice de ALPS-35 dans la membrane de DOPC (ΔG_{AC}) en utilisant la même approche que dans Fernandez-Vidal *et al.* (2011) (voir les méthodes section 3.5.5 pour plus de détail). À partir de la courbe d'ajustement (Figure 7.3) nous obtenons un ΔG_{AC} de -6,4 kcal/mol.

À titre de comparaison, l'énergie libre de partitionnement en hélice de la mélitine (peptide antimicrobien interfacial) avec des SUV de POPC est de -7,2 kcal/mol (Fernandez-Vidal *et al.*, 2011). L'énergie libre de partitionnement en hélice du peptide ALPS-35 étant moins négative, est donc moins favorable. Une raison probable est que l'hélicité de la mélitine (70 %) est plus importante que celle de ALPS-35 (38 %).

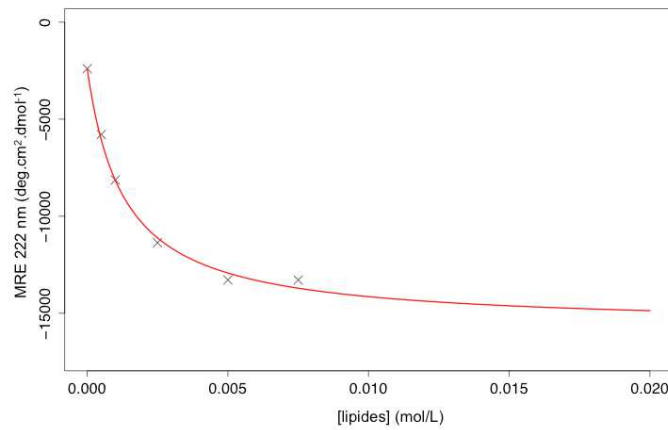


FIGURE 7.3 – Courbe d’ajustement pour l’estimation de l’énergie libre de partitionnement en hélice de ALPS-35 dans la membrane à partir du modèle de Fernandez-Vidal *et al.* (2011).

7.1.2 LE PEPTIDE ALPS-23

Pour le peptide ALPS-23, nous avons testé trois compositions lipidiques différentes (POPC, DOPC et DOPC/DOG) afin d’évaluer l’effet de la composition lipidique sur le partitionnement en hélice du peptide (Figure 7.4).

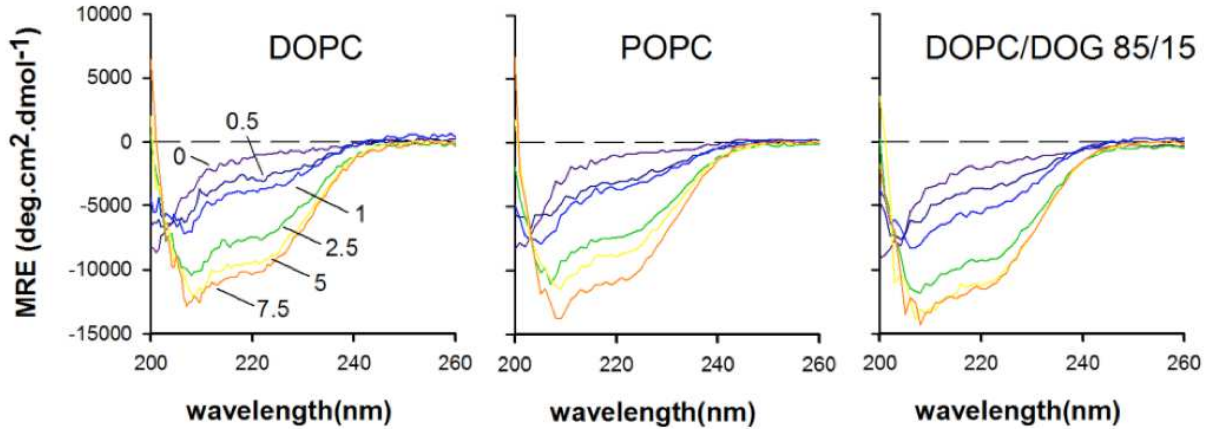


FIGURE 7.4 – Couplage partitionnement-repliement du peptide ALPS-23 dans trois membranes de composition lipidique différente. Titration avec des SUV de DOPC, POPC et DOPC/DOG.

Pour les trois compositions lipidiques, nous observons que le peptide ALPS-23 est non structuré en solution et adopte une hélice (minima caractéristiques à 208 et 222 nm) qui augmente progressivement avec la quantité de liposomes. Comme pour le peptide ALPS-35, le peptide ALPS-23 possède deux états principaux : non-structuré en solution et replié en hélice dans la membrane.

L’énergie de partitionnement en hélice (ΔG_{AC}) du peptide ALPS-23, calculée à partir

de la MRE à 222 nm pour les trois compositions lipidiques, est montrée dans le Tableau 7.1.

Composition des SUV	ΔG_{AC} (kcal/mol)
POPC	-5,7 kcal/mol
DOPC	-5,9 kcal/mol
DOPC/DOG	-6,0 kcal/mol

Tableau 7.1 – Énergie libre de partitionnement en hélice du peptide ALPS-23 pour trois compositions lipidiques différentes.

L'énergie libre de partitionnement en hélice du peptide ALPS-23 avec des SUV de DOPC est de -5,9 kcal/mol, ce qui est moins négatif que pour ALPS-35 (-6,4 kcal/mol). Si cette différence est significative, cette observation montre que l'énergie libre de partitionnement en hélice dans la membrane de DOPC est plus favorable pour le peptide ALPS-35 (évaluer la significativité nécessiterait de répéter plusieurs fois l'expérience de CD, ce que nous n'avons pas encore fait).

Maintenant si on regarde l'énergie libre de partitionnement en hélice en fonction de la composition lipidique, on s'aperçoit qu'elle tend à être légèrement plus négative avec l'augmentation des défauts de *packing* (POPC < DOPC < DOPC/DOG). Malgré la courbure qui promeut le partitionnement du peptide, il semble y avoir un très léger effet de la composition lipidique. A nouveau, pour s'en assurer, il faudrait refaire l'expérience de CD plusieurs fois pour pouvoir estimer l'erreur.

7.2 ÉNERGIE LIBRE DE PARTITIONNEMENT EN CONFORMATION NON STRUCTURÉE DU MOTIF ALPS DANS LA MEMBRANE

Pour estimer l'énergie libre de partitionnement en conformation non structurée des peptides ALPS-35 et ALPS-23 dans la membrane (ΔG_{AB}), nous avons utilisé l'échelle d'hydrophobie interfaciale de White et Wimley (1998); Wimley et White (1996). Elle est fondée sur l'énergie libre de transfert de l'eau vers la membrane de résidus au sein d'un peptide non structuré (*e.g.* AcWL-X-LL où X est l'un des 20 acides aminés). Cette échelle permet ainsi d'estimer si l'énergie libre de partitionnement en conformation non structurée est plus favorable dans la membrane que dans l'eau (en sommant la contribution de chaque résidu).

À partir de cette échelle, nous obtenons un ΔG_{AB} de 2,85 kcal/mol pour le peptide ALPS-35 contre -2,21 kcal/mol pour le peptide ALPS-23. Ce résultat suggère qu'en conformation non structurée le peptide ALPS-35 préfère être dans l'eau alors que le peptide ALPS-23 préfère être dans l'interface de la membrane. Pour comprendre pourquoi

l'énergie libre de partitionnement en conformation non structurée dans la membrane est si différente entre les deux peptides, nous avons estimé l'énergie libre cumulée le long de la séquence comme illustré dans la Figure 7.5.

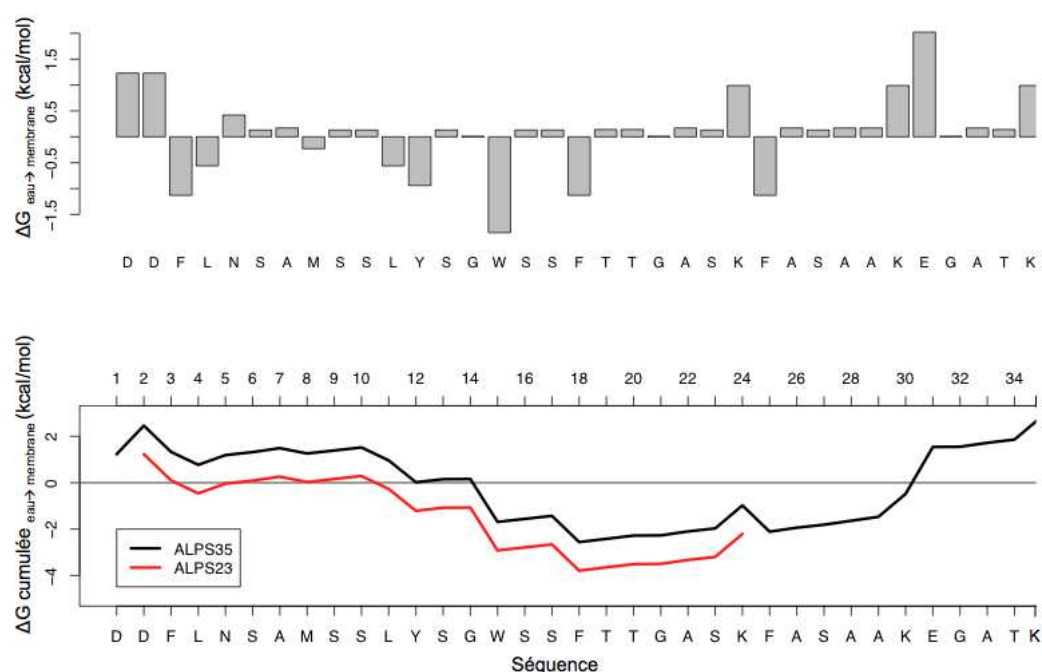


FIGURE 7.5 – Énergie libre du partitionnement des peptides ALPS-35 et ALPS-23 selon l'échelle de Wimley et White (1996). En haut, énergie libre (ΔG) de l'eau vers la membrane des résidus du peptide ALPS-35. En bas, énergie libre (ΔG_{AB}) cumulée le long de la séquence de l'eau vers la membrane des résidus des peptides ALPS-35 (en noir) et ALPS-23 (en rouge).

Nous montrons que l'énergie libre cumulée le long de la séquence augmente pour devenir positive dans la fin de la séquence de ALPS-35. Cette observation montre que ce sont les résidus en fin de séquence du peptide ALPS-35 qui tirent l'énergie libre vers le haut. En effet, l'énergie libre de partitionnement de ces résidus (Figure 7.5 en haut) est très positive en raison de leur charge. Néanmoins, ces valeurs ont été obtenues en suivant la stratégie de White qui considère que le peptide en conformation non structuré est complètement inséré dans la membrane. Il est possible que dans le cas du peptide ALPS-35, une partie du peptide soit dans l'eau plutôt que dans la membrane, ce qui expliquerait la différence importante d'énergie libre entre les deux peptides.

7.3 ÉNERGIE LIBRE DE REPLIEMENT DU MOTIF ALPS DANS L'INTERFACE

L'énergie libre de repliement en hélice des peptides ALPS-23 et ALPS-35 dans la membrane (ΔG_{BC}) a été obtenue en complétant le cycle thermodynamique ($\Delta G_{BC} = \Delta G_{AC} - \Delta G_{AB}$).

Nous obtenons un ΔG_{BC} de -3,69 kcal/mol pour le peptide ALPS-23 et -9,25 kcal/mol pour le peptide ALPS-35 kcal/mol, suggérant que l'énergie libre de repliement en hélice dans l'interface est beaucoup plus favorable pour le peptide ALPS-35.

Si on examine la contribution de chaque résidu pour le repliement, chaque résidu supplémentaire en hélice contribue à ΔG_{BC} de manière additive. La grande différence de ΔG_{BC} entre ALPS-35 et ALPS-23 est due au plus grand nombre de résidus en hélice de ALPS-35 (35 résidus \times 38 % d'hélicité = 13,3 résidus en hélice) que ALPS-23 (23 résidus \times 27 % d'hélicité = 6,2 résidus en hélice). Si on ramène l'énergie libre de repliement en hélice par résidu, cela donne une contribution d'environ -0,6 kcal/mol par résidu, valeur plus importante que celle proposée par White (-0,4 kcal/mol) sur les peptides AQL (Almeida *et al.*, 2012). La différence pourrait provenir de la composition des séquences, mais aussi de l'hélicité importante ($> 70\%$) des peptides AQL.

La Figure 7.6 résume les estimations des énergies libres de partitionnement, en hélice et en conformation non structurée, dans l'interface de la membrane.

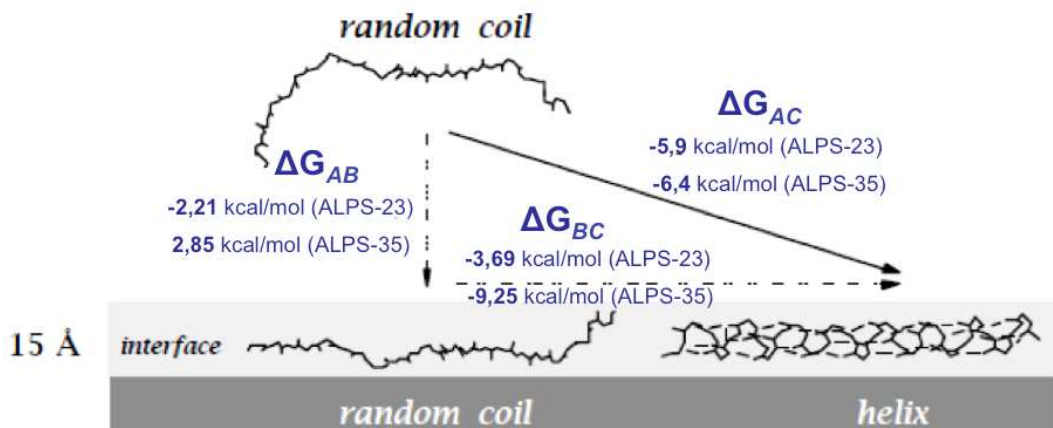


FIGURE 7.6 – Énergies libres de partitionnement, en hélice et en conformation non structurée, des peptides ALPS-35 et ALPS-23 dans l'interface d'une membrane de DOPC.

7.4 Y A-T-IL COOPÉRATIVITÉ ENTRE LES DÉFAUTS DE PACKING ET LE REPLIEMENT DE L'HÉLICE ?

Nous avons vu dans le chapitre 5 que l'insertion du motif ALPS est guidée par l'insertion de ses gros résidus hydrophobes dans des défauts de *packing* pré-existants. Pour savoir si le réservoir des défauts est suffisant pour accommoder le peptide en hélice, nous avons évalué la taille des défauts quand le peptide est inséré dans la membrane en conformation non structurée et en hélice comme illustré dans la Figure 7.7.

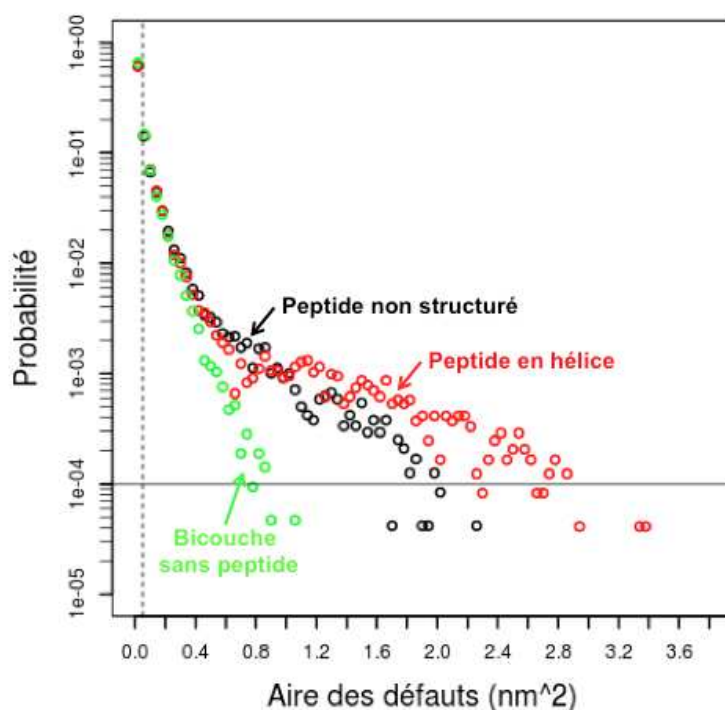


FIGURE 7.7 – Distribution de la taille des défauts de *packing* quand le peptide est inséré, en hélice et en conformation non structurée, dans l'interface d'une membrane de DOPC/DOG.

Les défauts de *packing* ont été évalués à partir des simulations de REMD réalisées avec le peptide ALPS-23 en présence d'une bicouche de DOPC/DOG (voir section 6.2.2). L'analyse a été faite de 100 à 200 ns pour la simulation en partant du peptide non structuré dans l'eau et de 0 à 100 ns en pour la simulation en partant du peptide replié en hélice- α et inséré dans l'interface de la membrane. À titre de comparaison, nous avons également évalué les défauts de *packing* dans une bicouche de DOPC/DOG en absence de peptide.

Comme attendu, les défauts de *packing* sont plus grands et plus nombreux quand le peptide est inséré dans la bicouche (ronds noirs et rouges) par comparaison à une bicouche sans peptide (ronds verts). Significativement, les défauts de *packing* sont plus grands

quand le peptide est replié en hélice (ronds rouges), ce qui montre qu’une conformation en hélice nécessite de plus grands défauts qu’une conformation non structurée.

Dans la section 7.3, nous avons vu que l’énergie libre de repliement du peptide ALPS-23 est favorable (-3,69 kcal/mol), ce qui montre qu’inexorablement le peptide va se replier en hélice sur une membrane contenant des défauts de *packing*. Alors pourquoi ne réussissons-nous pas à replier le peptide ALPS-23 par simulation ?

Comme la conformation en hélice nécessite de plus grands défauts que la conformation non structurée, il est possible que le coût de création d’une cavité suffisamment grande pour accommoder le peptide en hélice soit trop important pour être observé par simulation (la création de cette cavité représente une barrière qui ralentit la cinétique de formation de l’hélice). Néanmoins, la simulation du peptide entièrement replié en hélice inséré dans l’interface de la membrane mène à son dépliement avec une hélicité finale bien inférieure ($\sim 5\%$ selon DSSP) à la valeur expérimentale ($\sim 25\%$). Aussi nous suspectons en premier lieu un problème avec le champ de forces utilisé (combinaison OPLS-AA / Berger). Comme nous l’avons vu dans le chapitre précédent, d’autres auteurs ont remarqué que ce champ de forces ne prédisait pas l’hélicité expérimentale sur le peptide mélittine (Andersson *et al.*, 2013).

7.5 CONCLUSION

L’énergie libre de partitionnement en hélice est plus favorable pour le peptide ALPS-35 comparé au peptide ALPS-23. L’énergie libre de repliement en hélice est également plus favorable pour le peptide ALPS-35 car chaque résidu supplémentaire en hélice contribue à cette énergie de manière additive.

Il semble y avoir un très léger effet de la composition lipidique sur le partitionnement en hélice du peptide ALPS-23 mais pour s’en assurer il faudrait reproduire l’expérience de CD plusieurs fois pour évaluer l’erreur de mesure. En effet, les expériences de CD ont été réalisées avec des petits liposomes où l’effet de la composition peut être masqué par la courbure. Les grands liposomes auraient été plus adaptés mais comme ils diffusent la lumière de manière trop importante, les spectres de CD étaient trop bruités et donc non interprétables.

Enfin, les défauts présents sous le peptide sont plus grands lorsque le peptide est replié en hélice que lorsqu’il est non structuré. Ceci peut expliquer la cinétique lente de formation de l’hélice.

8

Conclusion et Perspectives

8.1 CONCLUSION

Le but de ce travail était de comprendre comment le motif ALPS reconnaît les défauts de *packing* entre les lipides. Pour répondre à cette question complexe, nous avons tout d'abord cherché à caractériser et quantifier les défauts de *packing*, puis nous avons examiné l'insertion, le repliement et l'affinité de liaison du motif ALPS dans l'interface d'une membrane contenant de tels défauts.

Nous montrons que le nombre et la taille des défauts de *packing* augmentent quand les chaînes aliphatiques saturées sont remplacées par des chaînes mono-insaturées ou quand le DOG est introduit dans une bicouche de DOPC. Significativement, l'introduction du DOG dans une bicouche plate de DOPC permet d'induire des défauts de *packing* similaires à ceux retrouvés dans le feuillet externe d'une membrane courbée positivement. Ce résultat montre que les défauts de *packing* correspondent bien à une imperfection dans l'agencement des lipides au sein de la bicouche, provoquée soit par la courbure de la membrane soit par la différence de forme entre les lipides.

Nous établissons également que l'introduction du DOG dans une bicouche plate de DOPC affecte plusieurs propriétés de la bicouche. La bicouche devient plus épaisse et moins rigide, les têtes polaires des DOPC sont moins ordonnées, les queues des DOPC sont plus ordonnées, la région polaire de la bicouche est plus hydratée et la pression latérale

augmente au niveau des chaînes aliphatiques. Toutes ces modifications étant dues au partitionnement du DOG plus au centre de la bicouche que le DOPC.

Nous observons que l’insertion du peptide ALPS-35 est guidée par l’insertion de ses gros résidus hydrophobes dans des défauts de *packing* pré-existants. L’insertion des résidus ne crée pas plus de défauts dans la bicouche, le résidu va juste stabiliser le défaut dans lequel il s’est inséré. Nous observons également que l’insertion des résidus est réduite dans une bicouche contenant moins de défauts de *packing* telle une bicouche de DMPC. Ces observations prouvent que les défauts de *packing* sont nécessaires à l’insertion du motif ALPS dans la membrane.

Bien qu’expérimentalement les peptides ALPS-35 et ALPS-23 se replient en hélice avec de grands liposomes enrichis en DOG, nous n’avons pas pu observer le repliement de ces peptides par simulation. En utilisant deux approches permettant d’augmenter l’échantillonnage (simulations à haute température et REMD), nous obtenons un pourcentage d’hélicité bien inférieur à celui obtenu expérimentalement. Nous pensons que cette différence vient du champ de forces utilisé (combinaison OPLS-AA / Berger). En effet, avec une simulation de REMD, en partant du peptide complètement replié en hélice et inséré dans la membrane, nous observons la disparition progressive de l’hélice. Par ailleurs, en plus des simulations de REMD classique, nous avons essayé d’implémenter une variante du REMD nommée REST2 (Wang *et al.*, 2011) qui permet de réduire le nombre de répliques nécessaires tout en améliorant l’échantillonnage du peptide. Malheureusement nous n’avons pas obtenu de résultats concluants, sans doute à cause d’un problème d’implémentation de la méthode dans le logiciel GROMACS.

Enfin, en comparant le partitionnement en hélice dans l’interface de la membrane du peptide ALPS-35 à celui de ALPS-23, il semble que plus la séquence du motif ALPS est longue, plus l’affinité de liaison est importante. De plus, nous constatons un très léger effet de la composition lipidique sur l’affinité de liaison du peptide ALPS-23. Il est probable que cette légère différence soit due au fait que nous avons utilisé des liposomes très courbés où l’effet de la composition est masqué par la courbure.

8.2 PERSPECTIVES

Dans ce travail, les défauts de *packing* ont été caractérisés en terme d’aire projetée car nous voulions comparer nos résultats à ceux de Cui *et al.* (2011) où l’étude a été faite à la fois avec une bicouche plate et une bicouche courbée. Mais comme une chaîne latérale se caractérise plutôt en terme de volume, il serait judicieux de caractériser et quantifier ces défauts également en terme de volume. On pourrait ainsi vérifier si la distribution de la taille des défauts change lorsqu’on utilise les volumes à la place des aires projetées.

Nous pensons que la méthode de Voronoï serait bien adaptée pour ce type d'étude car elle donne accès au volume de chaque élément du système.

Concernant les défauts de *packing*, il conviendrait aussi d'étudier leur diffusion et leur temps de vie. Une première estimation montre que la dynamique des défauts est de l'ordre de la dizaine à la centaine de ps, suggérant une dynamique très rapide. Toutefois, comme cette estimation est seulement visuelle, il serait nécessaire de l'approfondir pour pouvoir en tirer des conclusions.

Avec nos simulations, les événements d'insertion n'étaient pas suffisamment nombreux pour obtenir des statistiques significatives. Il serait donc intéressant de réaliser des PMF avec les deux peptides minimaux du motif ALPS (SFLG et SLG) à travers une bicouche contenant beaucoup de défauts de *packing* comme la bicouche DOPC/DOG et une bicouche en contenant peu comme la bicouche de DMPC. Ainsi, on pourrait estimer l'énergie libre d'insertion des gros résidus hydrophobes dans deux bicouches présentant un *packing* opposé. Il serait également souhaitable d'estimer le coût de la désolvatation de l'eau lorsque les résidus s'insèrent dans les défauts, car pour qu'un résidu s'insère dans un défaut il faut que de l'eau s'en échappe.

Pour vérifier l'hypothèse que le champ de forces (combinaison OPLS-AA / Berger) ne réussit pas à replier le peptide ALPS-23, nous avons prévu de tester d'autres champs de forces comme AMBER et CHARMM qui sont connus pour reproduire correctement le repliement en hélice. Pour tester ces champs de forces, nous envisageons de travailler avec un peptide plus simple que le peptide ALPS-23 (avec une hélicité élevée, une séquence plus courte et une séquence en acides aminés plus classique) comme le mastoparan. Nous aimerions également tester des variantes du REMD améliorant la convergence, par exemple le REMD couplé à un réservoir à haute température (Henriksen *et al.*, 2013; Okur *et al.*, 2007; Roitberg *et al.*, 2007). Cette méthode consiste à pré-générer un ensemble de conformations (à la plus haute température qu'on souhaite simuler) que l'on stocke dans un réservoir. Ensuite, le principe est analogue à celui d'une simulation de REMD classique mais le réplica le plus haut échange avec une des conformations du réservoir prise au hasard (échange classique basé sur un critère de Metropolis). L'avantage est que le réservoir, s'il est bien généré, peut injecter de nouvelles conformations plus rapidement que par un réplica normal à la même température.

En collaboration avec Liza Mouret, nous projetons de déterminer la structure tridimensionnelle du peptide ALPS-23 par RMN. De premiers résultats ont été obtenus en micelle de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) mais le challenge sera de déterminer la structure en présence de liposomes.

Pour évaluer l'affinité de liaison du motif ALPS en fonction de la composition lipidique et de la courbure, il faudrait utiliser d'autres techniques que le CD où les grands liposomes

rendent la mesure trop difficile. Nous pensons à la calorimétrie (ITC, *Isothermal titration calorimetry*), la fluorescence du tryptophane (qui mesure l'enfouissement du tryptophane) et à la flottaison (qui mesure le pourcentage de peptides liés) pour pouvoir travailler à la fois avec des grands et des petits liposomes. Ainsi, il serait possible de mesurer l'affinité de liaison du motif en faisant varier à la fois la composition lipidique et la courbure.

Enfin, pour comprendre plus avant l'hypersensibilité du motif ALPS pour les membranes riches en défauts de *packing*, il est essentiel de mieux comprendre encore comment le motif ALPS se replie en hélice sur une membrane riche en défauts et pourquoi il ne se replie pas en hélice sur une membrane avec moins de défauts. Une des pistes pourrait être la présence de plusieurs résidus glycine dans sa séquence qui lui confèrent plus de flexibilité dans une membrane riche en défauts de *packing* (Gonzalez-Rubio *et al.*, 2011). De plus, la présence de ces résidus glycine pourrait également expliquer pourquoi le motif ALPS est moins hélicoïdal que les hélices amphipathiques plus classiques comme celles des peptides antimicrobiens. Il serait donc essentiel de muter ces résidus glycines pour savoir si la flexibilité du motif ALPS joue un rôle dans la reconnaissance des défauts de *packing* et donc de la courbure.

Bibliographie

- Almeida P.F., Ladokhin A.S., White S.H. (2012) Hydrogen-bond energetics drive helix formation in membrane interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1818**, 178–182.
- Almeida P.F., Pokorny A. (2009) Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides : from kinetics to thermodynamics. *Biochemistry*, **48**, 8083–93.
- Andersson M., Ulmschneider J.P., Ulmschneider M.B., White S.H. (2013) Conformational states of melittin at a bilayer interface. *Biophys J*, **104**, L12–4.
- Antonny B. (2011) Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annu Rev Biochem*, **80**, 101–23.
- Antonny B., Huber I., Paris S., Chabre M., Cassel D. (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 gtpase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem*, **272**, 30848–51.
- Aridor M., Hannan L.A. (2000) Traffic jam : a compendium of human diseases that affect intracellular transport processes. *Traffic*, **1**, 836–51.
- Aridor M., Hannan L.A. (2002) Traffic jams II : an update of diseases of intracellular transport. *Traffic*, **3**, 781–90.
- Auluck P.K., Caraveo G., Lindquist S. (2010) alpha-synuclein : membrane interactions and toxicity in parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **26**, 211–33.
- Aussenac F., Laguerre M., Schmitter J.m., Dufourc E.J. (2003) Detailed structure and dynamics of bicelle phospholipids using selectively deuterated and perdeuterated labels. 2H NMR and molecular mechanics study. *Structure*, pp. 10468–10479.
- Bachar M., Brunelle P., Tieleman D.P., Rauk A. (2004) Molecular dynamics simulation of a polyunsaturated lipid bilayer susceptible to lipid peroxidation. *The Journal of Physical Chemistry B*, **108**, 7170–7179.
- Barlowe C. (1998) COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, **1404**, 67–76.
- Belgareh N., Rabut G., Bai S.W. *et al.* (2001) An evolutionarily conserved npc subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol*, **154**, 1147–60.

- Berendsen H.J., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of chemical physics*, **81**, 3684.
- Berger O., Edholm O., Jähnig F. (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal*, **72**, 2002–2013.
- Berke I.C., Boehmer T., Blobel G., Schwartz T.U. (2004) Structural and functional analysis of Nup133 domains reveals modular building blocks of the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **167**, 591–7.
- Bigay J., Casella J.F., Drin G., Mesmin B., Antonny B. (2005) ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J*, **24**, 2244–2253.
- Bigay J., Gounon P., Robineau S., Antonny B. (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature*, **426**, 563–6.
- Bonifacino J.S., Glick B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, **116**, 153–66.
- Bonifacino J.S., Lippincott-Schwartz J. (2003) Coat proteins : shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 409–14.
- Brandt E.G., Braun A.R., Sachs J.N., Nagle J.F., Edholm O. (2011) Interpretation of fluctuation spectra in lipid bilayer simulations. *Biophys J*, **100**, 2104–11.
- Bussi G., Donadio D., Parrinello M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*, **126**, 014101–014101.
- Cardenas J., Rivero S., Goud B., Bornens M., Rios R.M. (2009) Golgi localisation of GMAP210 requires two distinct cis-membrane binding mechanisms. *BMC Biol*, **7**, 56.
- Caro L.G., Palade G.E. (1964) Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. an autoradiographic study. *J Cell Biol*, **20**, 473–95.
- Copeland D.E., Dalton A.J. (1959) An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J Biophys Biochem Cytol*, **5**, 393–6.
- Cui H., Lyman E., Voth G.A. (2011) Mechanism of membrane curvature sensing by amphipathic helix containing proteins. *Biophysical journal*, **100**, 1271–1279.
- Cukierman E., Huber I., Rotman M., Cassel D. (1995) The ARF1 GTPase-activating protein : zinc finger motif and golgi complex localization. *Science*, **270**, 1999–2002.
- Darden T., York D., Pedersen L. (1993) Particle mesh ewald : An N log (N) method for ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*, **98**, 10089.

- Das S., Rand R.P. (1984) Diacylglycerol causes major structural transitions in phospholipid bilayer membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, **124**, 491–6.
- Das S., Rand R.P. (1986) Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry*, **25**, 2882–9.
- Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, **273**, 9443–9.
- De Brevern A., Etchebest C., Hazout S. (2000) Bayesian probabilistic approach for predicting backbone structures in terms of protein blocks. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, **41**, 271–287.
- Doucet C.M., Talamas J.A., Hetzer M.W. (2010) Cell cycle-dependent differences in nuclear pore complex assembly in metazoa. *Cell*, **141**, 1030–41.
- Douliez J.P., Ferrarini A., Dufourc E.J. (1998) On the relationship between cc and cd order parameters and its use for studying the conformation of lipid acyl chains in biomembranes. *The Journal of chemical physics*, **109**, 2513.
- Drin G., Antonny B. (2010) Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett*, **584**, 1840–7.
- Drin G., Casella J.F., Gautier R., Boehmer T., Schwartz T.U., Antonny B. (2007) A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 138–46.
- Drin G., Morello V., Casella J.F., Gounon P., Antonny B. (2008) Asymmetric tethering of flat and curved lipid membranes by a golgin. *Science*, **320**, 670–673.
- Dror R.O., Jensen M.O., Borhani D.W., Shaw D.E. (2010) Exploring atomic resolution physiology on a femtosecond to millisecond timescale using molecular dynamics simulations. *J Gen Physiol*, **135**, 555–62.
- Duman J.G., Forte J.G. (2003) What is the role of snare proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C237–49.
- Edholm O., Nagle J.F. (2005) Areas of molecules in membranes consisting of mixtures. *Biophys J*, **89**, 1827–32.
- Eisenberg D., Weiss R.M., Terwilliger T.C. (1982) The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, **299**, 371–4.
- Fernandez-Vidal M., White S.H., Ladokhin A.S. (2011) Membrane partitioning : "classical" and "nonclassical" hydrophobic effects. *J Membr Biol*, **239**, 5–14.
- Filippov A., Oradd G., Lindblom G. (2003) The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophys J*, **84**, 3079–86.

- Ganz T., Lehrer R.I. (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol*, **10**, 41–4.
- Gautier R., Douguet D., Antonny B., Drin G. (2008) Heliquet : a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics*, **24**, 2101–2.
- Goldberg J. (1999) Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell*, **96**, 893–902.
- Goñi F.M., Alonso A. (1999) Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. *Progress in lipid research*, **38**, 1–48.
- Gonzalez-Rubio P., Gautier R., Etchebest C., Fuchs P.F. (2011) Amphipathic-lipid-packing-sensor interactions with lipids assessed by atomistic molecular dynamics. *Biochim Biophys Acta*, **1808**, 2119–27.
- Henriksen N.M., Roe D.R., Cheatham T.E. (2013) Reliable oligonucleotide conformational ensemble generation in explicit solvent for force field assessment using reservoir replica exchange molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, **117**, 4014–4027.
- Hess B. (2008) P-lincs : A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **4**, 116–122.
- Hess B., Kutzner C., Van Der Spoel D., Lindahl E. (2008) Gromacs 4 : Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*, **4**, 435–447.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, **284**, 1313–8.
- Hopkins A.L., Groom C.R. (2002) The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 727–30.
- Hristova K., Wimley W.C., Mishra V.K., Anantharamiah G.M., Segrest J.P., White S.H. (1999) An amphipathic alpha-helix at a membrane interface : a structural study using a novel X-ray diffraction method. *J Mol Biol*, **290**, 99–117.
- Hukushima K., Nemoto K. (1996) Exchange Monte Carlo method and application to spin glass simulations. *Journal of the Physical Society of Japan*, **65**, 1604–1608.
- Hunenberger P.H., Mark A.E., van Gunsteren W.F. (1995) Fluctuation and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations. *J Mol Biol*, **252**, 492–503.
- Infante C., Ramos-Morales F., Fedriani C., Bornens M., Rios R.M. (1999) GMAP-210, a cis-golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J Cell Biol*, **145**, 83–98.

- Jamieson J.D., Palade G.E. (1967) Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J Cell Biol*, **34**, 597–615.
- Janmey P.A., Kinnunen P.K. (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol*, **16**, 538–46.
- Jorgensen (1986) Monte Carlo simulations of the hydration of ammonium and carboxylate ions. **47907**, 2174–2182.
- Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics*, **79**, 926.
- Joseph A.P., Agarwal G., Mahajan S. *et al.* (2010) A short survey on protein blocks. *Biophysical Reviews*, **2**, 137–145.
- Kabsch W., Sander C. (1983) Dictionary of protein secondary structure : pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577–2637.
- Kirchhausen T. (2000) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 187–98.
- Koren E., Torchilin V.P. (2012) Cell-penetrating peptides : breaking through to the other side. *Trends in molecular medicine*, **18**, 385–393.
- Krabben L., Fassio A., Bhatia V.K. *et al.* (2011) Synapsin I senses membrane curvature by an amphipathic lipid packing sensor motif. *J Neurosci*, **31**, 18149–54.
- Kucerka N., Liu Y., Chu N., Petrache H.I., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. (2005a) Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles. *Biophys J*, **88**, 2626–37.
- Kucerka N., Nieh M.P., Katsaras J. (2011) Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim Biophys Acta*, **1808**, 2761–71.
- Kucerka N., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. (2005b) Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J Membr Biol*, **208**, 193–202.
- Kumar S., Rosenberg J.M., Bouzida D., Swendsen R.H., Kollman P.A. (1992) The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. i. the method. *Journal of Computational Chemistry*, **13**, 1011–1021.
- van den Brink-van der Laan E., Killian J.A., de Kruijff B. (2004) Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 275–88.
- Lehrer R.I., Ganz T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol*, **11**, 23–7.

- Lemmon M.A. (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 99–111.
- Leontiadou H., Mark A.E., Marrink S.J. (2006) Antimicrobial peptides in action. *J Am Chem Soc*, **128**, 12156–61.
- Lindahl E., Edholm O. (2000) Spatial and energetic-entropic decomposition of surface tension in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, **113**, 3882.
- Mandiyan V., Andreev J., Schlessinger J., Hubbard S.R. (1999) Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *EMBO J*, **18**, 6890–8.
- Martinez-Seara H., Rog T., Karttunen M., Reigada R., Vattulainen I. (2008) Influence of cis double-bond parametrization on lipid membrane properties : how seemingly insignificant details in force-field change even qualitative trends. *J Chem Phys*, **129**, 105103.
- van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. (2008) Membrane lipids : where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 112–24.
- Mesmin B., Drin G., Levi S. *et al.* (2007) Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry*, **46**, 1779–90.
- Miyamoto S., Kollman P.A. (1992) Settle : an analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models. *Journal of computational chemistry*, **13**, 952–962.
- Nagle J.F., Tristram-Nagle S. (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, **1469**, 159–95.
- Nuscher B., Kamp F., Mehnert T. *et al.* (2004) Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane : a thermodynamics study. *J Biol Chem*, **279**, 21966–75.
- Nymeyer H., Woolf T.B., Garcia A.E. (2005) Folding is not required for bilayer insertion : replica exchange simulations of an alpha-helical peptide with an explicit lipid bilayer. *Proteins*, **59**, 783–90.
- Okur A., Roe D.R., Cui G., Hornak V., Simmerling C. (2007) Improving convergence of replica-exchange simulations through coupling to a high-temperature structure reservoir. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **3**, 557–568.
- Ollila S.O.H., Hyvonen M.T., Vattulainen I. (2007a) Polyunsaturation in lipid membranes : dynamic properties and lateral pressure profiles. *J Phys Chem B*, **111**, 3139–50.
- Ollila S.O.H., Risselada H.J., Louhivuori M., Lindahl E., Vattulainen I., Marrink S.J. (2009) 3D pressure field in lipid membranes and membrane-protein complexes. *Phys Rev Lett*, **102**, 078101.

- Ollila S.O.H., Rog T., Karttunen M., Vattulainen I. (2007b) Role of sterol type on lateral pressure profiles of lipid membranes affecting membrane protein functionality : Comparison between cholesterol, desmosterol, 7-dehydrocholesterol and ketosterol. *J Struct Biol*, **159**, 311–23.
- Oradd G., Lindblom G., Fontell K., Ljusberg-Wahren H. (1995) Phase diagram of soybean phosphatidylcholine-diacylglycerol-water studied by x-ray diffraction and ³¹p- and pulsed field gradient 1H-NMR : evidence for reversed micelles in the cubic phase. *Biophys J*, **68**, 1856–63.
- Orci L., Glick B.S., Rothman J.E. (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin : its possible role in protein transport within the golgi stack. *Cell*, **46**, 171–84.
- Orci L., Stannnes M., Ravazzola M. *et al.* (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*, **90**, 335–49.
- Ouberaï M.M., Wang J., Swann M.J. *et al.* (2013) α -synuclein senses lipid packing defects and induces lateral expansion of lipids leading to membrane remodeling. *Journal of Biological Chemistry*.
- Palade G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347–58.
- Papayannopoulos V., Co C., Prehoda K.E., Snapper S., Taunton J., Lim W.A. (2005) A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP(2) density. *Molecular cell*, **17**, 181–191.
- Parrinello M., Rahman A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals : A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*, **52**, 7182.
- Patriksson A., van der Spoel D. (2008) A temperature predictor for parallel tempering simulations. *Phys Chem Chem Phys*, **10**, 2073–7.
- Peitzsch R.M., McLaughlin S. (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles : pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*, **32**, 10436–43.
- Peter B.J., Kent H.M., Mills I.G. *et al.* (2004) Bar domains as sensors of membrane curvature : the amphiphysin bar structure. *Science*, **303**, 495–9.
- Pranke I.M., Morello V., Bigay J. *et al.* (2011) α -synuclein and alps motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. *J Cell Biol*, **194**, 89–103.
- Rawicz W., Olbrich K.C., McIntosh T., Needham D., Evans E. (2000) Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys J*, **79**, 328–39.
- Raychaudhuri S., Im Y.J., Hurley J.H., Prinz W.A. (2006) Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to er requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J Cell Biol*, **173**, 107–19.

- Roitberg A.E., Okur A., Simmerling C. (2007) Coupling of replica exchange simulations to a non-boltzmann structure reservoir. *The Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 2415–2418.
- Roth T.F., Porter K.R. (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito aedes aegypti. 1. *J Cell Biol*, **20**, 313–32.
- Rothman J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**, 55–63.
- Rothman J.E., Wieland F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science*, **272**, 227–34.
- Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints : molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, **23**, 327–341.
- de Saint-Jean M., Delfosse V., Douguet D. *et al.* (2011) Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *The Journal of cell biology*, **195**, 965–978.
- Schekman R., Orci L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271**, 1526–33.
- Schiffer M., Edmundson A.B. (1967) Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys J*, **7**, 121–35.
- Schmid S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting : an integrated process. *Annu Rev Biochem*, **66**, 511–48.
- Seelig J. (2004) Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 40–50.
- Singer S.J., Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720–31.
- Sugita Y., Okamoto Y. (1999) Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*, **314**, 141–151.
- Tan S., Tan H.T., Chung M.C. (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*, **8**, 3924–32.
- Torrie G.M., Valleau J.P. (1977) Nonphysical sampling distributions in monte carlo free-energy estimation : Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*, **23**, 187–199.
- Tristram-Nagle S., Petrache H.I., Nagle J.F. (1998) Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys J*, **75**, 917–25.
- Ulmschneider M.B., Doux J.P., Killian J.A., Smith J.C., Ulmschneider J.P. (2010) Mechanism and kinetics of peptide partitioning into membranes from all-atom simulations of thermostable peptides. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 3452–3460.
- Vamparys L., Gautier R., Vanni S. *et al.* (2013) Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys J*, **104**, 585–93.

- Vanni S., Vamparys L., Gautier R. *et al.* (2013) Amphipathic lipid packing sensor motifs : probing bilayer defects with hydrophobic residues. *Biophys J*, **104**, 575–84.
- Waheed Q., Edholm O. (2009) Undulation contributions to the area compressibility in lipid bilayer simulations. *Biophys J*, **97**, 2754–60.
- Wang L., Friesner R.A., Berne B.J. (2011) Replica exchange with solute scaling : a more efficient version of replica exchange with solute tempering (REST2). *J Phys Chem B*, **115**, 9431–8.
- White S.H., Wimley W.C. (1998) Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 339–52.
- White S.H., Wimley W.C., Ladokhin A.S. (1998) Energetics of peptide–bilayer interactions. *Methods in enzymology*, **295**, 62–87.
- Wiener M.C., White S.H. (1992) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. ii. distribution and packing of terminal methyl groups. *Biophys J*, **61**, 428–33.
- Wieprecht T., Apostolov O., Beyermann M., Seelig J. (1999) Thermodynamics of the alpha-helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment : implications for the peptide-membrane binding equilibrium. *J Mol Biol*, **294**, 785–94.
- Wilz L., Fan W., Zhong Q. (2011) Membrane curvature response in autophagy. *Autophagy*, **7**, 1249–1250.
- Wimley W.C., White S.H. (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol*, **3**, 842–8.
- Wohlert J., Edholm O. (2006) Dynamics in atomistic simulations of phospholipid membranes : Nuclear magnetic resonance relaxation rates and lateral diffusion. *J Chem Phys*, **125**, 204703.
- Yang L., Weiss T.M., Lehrer R.I., Huang H.W. (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes : magainin and protegrin. *Biophys J*, **79**, 2002–9.
- Yeung T., Terebiznik M., Yu L. *et al.* (2006) Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science*, **313**, 347–51.
- Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**, 389–95.
- Zigoneanu I.G., Pielak G.J. (2012) Interaction of α -synuclein and a cell penetrating fusion peptide with higher eukaryotic cell membranes assessed by ^{19}F NMR. *Molecular pharmaceuticals*, **9**, 1024–1029.

Appendice

**Area A, hydrophobic thickness $2D_C$, and bending modulus K_C
for fully hydrated fluid (L_α) lipid bilayers** (5/2011)

Lipid	T (°C)	D_{HH} (Å)	A (Å ²)	$2D_C$ (Å)	K_C/kT
DPPC	50	38.0 ^d	62.9(±1.3) ^a , 64.0 ^b , 64.3 ^c , 63.1 ^{d*}	29.2 ^a , 28.5 ^b , 27.9 ^c , 28.4 ^{d*}	15.0 ^{**e}
DHPC	48	38.2 ^e	65.1 ^e	27.6 ^e	9.4 ^e
DLPE	35	35.6 ^b	51.2 ^b	25.8 ^b	-
DMPC	30	35.3 ^g	59.7 ^f , 60.6 ^g	26.2 ^f , 25.4 ^g	15.8 ^{**g}
DLPC	30	30.8 ^g	63.2 ^g	20.9 ^g	13.2 ^g
DOPC	30	36.7 ^d	72.2 ^h , 72.5 ^b , 72.1 ⁱ , 72.4 ^{l,k} , 67.4 ^{d*}	27.2 ^h , 27.1 ^b , 27.2 ⁱ , 26.8 ^{l,k} , 28.8 ^{d*}	18.2 ^{**}
to be rescaled	(15)	37.6 ^k	69.1 ^k	27.7 ^k	20.3 ^k
T trends correct	(45)	36.1 ^k	75.5 ^k	26.2 ^k	17.2 ^k
DOPS	30	38.4 ^l	65.3 ^l	30.2 ^l	-
EggPC	30	35.4 ^f	69.4 ^{f,b}	27.2 ^f , 27.1 ^b	-
POPC	30	37.0 ^j	68.3(±1.5) ^j	27.1 ^j	20.3 ^j
SOPC	30	39.1 ^m	67.0(±0.9) ^m	29.2(±0.4) ^m	21.5 ^m
diC22:1PC	30	44.4 ^j	69.3 ^j	34.4 ^j	30.4 ^j
18:0-22:5PC	24	37.9 ⁿ	68.7 ⁿ	30.5 ⁿ	25.6 ^{**}
18:0-22:6PC	24	37.9 ⁿ	68.2 ⁿ	30.5 ⁿ	18.9 ^{**}
DiphytanoylPC	30	36.4 ^r	80.5(±1.5) ^r	27.2 ^r	12.4 ^r
Typical uncertainties	0.1	0.1	0.5-1.0	0.3-0.5	0.5-1.0

The most robust thickness from X-ray is the head-head thickness D_{HH} . Numbers for $2D_C$ and A are being critically reviewed and updated. In particular, it is now clear from ref d that for DOPC the smallest value of A and the largest value of $2D_C$ are the ones in agreement with neutron scattering; other temperatures should be rescaled. Similar reanalysis for DPPC did not make such a large difference, but other lipids have not yet been similarly reanalyzed. The product of A and $2D_C$ is more robust than either alone.

^aBiophys.J. 70:1419(1996); ^bBiochim.Biophys.Acta: Reviews on Biomembranes 1469:159(2000); ^cBiophys.J.:Biophys.Lett 90:L83(2006);

^dBiophys.J. 95:2356(2008); ^eChem.Phys.Lipids 160:33(2009); ^fChem.Phys.Lipids 95:83(1998); ^gBiophys.J. 88:2626(2005); ^hBiophys.J. 75:917(1998);

ⁱPhys.Rev.E 69:040901(2004); ^jJ.Membr.Biol. 208:193(2005); ^kBiophys.J. 94:117(2008); ^lBiophys.J. 86:1574(2004);

^mBiochim.Biophys.Acta 1178:1120(2008); ⁿJ.Am.Chem.Soc. 125:6409(2003); ^oBiophys.J. 83:3324(2002); ^pBiophys.J. 64:1097(1993);

^qBiophys.J. 71:885(1996); ^rChem.Phys.Lipids 163:630(2009). *Neutron data; **Upon reanalysis(2009)

Tableau 1 – Résumé des mesures expérimentales sur les bicouches. Tiré de lipid.phys.cmu.edu.

Phosphatidylcholine		Phosphatidylglycerol (Sodium Salt)		
Product	T _m (°C)	Product	T _m (°C)	
12:0 PC (DLPC)	-1	12:0 PG (DLPG)	-3	
13:0 PC	14	14:0 PG (DMPG)	23	
14:0 PC (DMPC)	23	16:0 PG (DPPG)	41	
15:0 PC	33	18:0 PG (DSPG)	55	
16:0 PC (DPPC)	41	18:1 PG (DOPG)	-18	
17:0 PC	48	16:0-18:1 PG (POPG)	-2	
18:0 PC (DSPC)	55	Phosphatidylserine (Sodium Salt)		
19:0 PC	60	14:0 PS (DMPS)	35	
20:0 PC	66	16:0 PS (DPPS)	54	
21:0 PC	72	18:0 PS (DSPS)	68	
22:0 PC	75	18:1 PS (DOPS)	-11	
23:0 PC	79	16:0-18:1 PS (POPS)	14	
24:0 PC	80	Phosphatidic Acid (Sodium Salt)		
16:1 PC	-36	12:0 PA (DLPA)	31	
18:1c9 PC (DOPC)	-20	14:0 PA (DMPA)	50	
18:1t9 PC	12	16:0 PA (DPPA)	67	
18:1c6 PC	1	18:0 PA (DSPA)	75	
18:2 PC	-53	18:1 PA DOPA)	-8	
18:3 PC	-60	16:0-18:1 PA (POPA)	28	
20:4 PC	-70	Phosphatidylethanolamine		
14:0-16:0 PC	35		T _m (°C)	T _h (°C)
14:0-18:0 PC	40	12:0 PE (DLPE)	29	
16:0-14:0 PC	27	14:0 PE (DMPE)	50	
16:0-18:0 PC	49	16:0 PE (DPPE)	63	118
16:0-18:1 PC (POPC)	-2	18:0 PE(DSPE)	74	100
16:0-22:6 PC	-27	20:0 PE	83	96
18:0-14:0 PC	30	18:1c9 PE (DOPE)	-16	10
18:0-16:0 PC	44	18:1t9 PE	38	64
18:0-18:1 PC	6	18:2 PE	-40	-15
18:1-16:0 PC	-9	18:3 PE		-30
18:1-18:0 PC	9	16:0-18:1 PE (POPE)	25	71

Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins, Dr. John R. Silvius, *Lipid-Protein Interactions*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1982, Reprinted with permission from John Wiley & Sons, Inc.

Lipid Thermotropic Phase Transition Data base ([LIPIDAT](https://lipidat.nist.gov/)) – NIST Standard Reference Database

Tableau 2 – Températures de transition de phase pour les glycérophospholipides. Tiré de avantlipids.com.

Conical Lipids in Flat Bilayers Induce Packing Defects Similar to that Induced by Positive Curvature

Lydie Vamparys,^{†‡§} Romain Gautier,[¶] Stefano Vanni,[¶] W. F. Drew Bennett,^{||} D. Peter Tieleman,^{||} Bruno Antony,[¶] Catherine Etchebest,^{†‡§} and Patrick F. J. Fuchs^{†‡§*}

[†]INSERM, U665, Paris, France; [‡]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [§]Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France; [¶]Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS, Université de Nice Sophia Antipolis, Valbonne, France; and ^{||}Department of Biological Sciences, and Institute for Biocomplexity and Informatics, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

ABSTRACT In biological membranes, changes in lipid composition or mechanical deformations produce defects in the geometrical arrangement of lipids, thus allowing the adsorption of certain peripheral proteins. Here, we perform molecular dynamics simulations on bilayers containing a cylindrical lipid (PC) and a conical lipid (DOG). Profiles of atomic density and lateral pressure across the bilayer show differences in the acyl chain region due to deeper partitioning of DOG compared to PC. However, such analyses are less informative for the interfacial region where peripheral proteins adsorb. To circumvent this limitation, we develop, to our knowledge, a new method of membrane surface analysis. This method allows the identification of chemical defects, where hydrocarbon chains are accessible to the solvent, and geometrical defects, i.e., voids deeper than the glycerol backbone. The size and number of both types of defects increase with the number of monounsaturated acyl chains in PC and with the introduction of DOG, although the defects do not colocalize with the conical lipid. Interestingly, the size and probability of the defects promoted by DOG resemble those induced by positive curvature, thus explaining why conical lipids and positive curvature can both drive the adsorption of peripheral proteins that use hydrophobic residues as membrane anchors.

INTRODUCTION

The compact arrangement of lipids in biological membranes can be altered in several ways. Thus, membranes contain substantial amounts of lipids such as PE or DAG whose intrinsic conical shape makes them less prone to align within the bilayer than abundant cylindrical lipids such as PC (1,2). Furthermore, membranes are frequently deformed by external forces (motors, cytoskeleton, or protein coats) and adopt shapes such as tubes, discs, or vesicles, where lipid molecules are necessarily tilted (3–6). These considerations raise the question of packing defects. To what extent do the presence of conical lipids in a flat membrane or the application of an external force cause imperfections in the geometrical arrangement of lipids?

In a physiological context, the presence of lipid packing defects in membranes can be an asset. In the endoplasmic reticulum, they may facilitate the folding of nascent transmembrane proteins (7). In small transport vesicles, they create stress that makes the membrane more prone to undergo fusion (8). Finally, lipid packing defects seem essential for the membrane adsorption of various peripheral proteins (1,2,9,10). Striking examples are CTP:phosphocholine cytidyltransferase (11–13) and ArfGAP1 (14–16) whose binding to lipid membranes is strongly favored by

the presence of conical lipids and/or by positive curvature (when the protein faces a convex membrane surface).

At first glance, a lipid packing defect induced by a conical lipid in a flat membrane or by positive curvature should resemble a void in the interfacial zone (14,15,17). However, this picture is probably oversimplified. First, lipids are not stiff objects: by twisting their flexible acyl chains they could minimize unfavorable exposure to water (13). Second, lateral diffusion could attenuate the misalignment of lipid molecules: lipids with complementary shape could cluster (e.g., a cone with an inverted cone) or lipids with a specific shape could accumulate in regions of favorable geometry (e.g., a cone in a region of negative curvature). However, recent measurements as well as theoretical calculations suggest that these processes are not very efficient due to entropic cost (18–22). These various considerations emphasize the need for a better atomic description of packing defects in lipid bilayers that are under physical (bending) or chemical (presence of conical lipids) stress.

So far, only a few simulation studies with various DAG species have been reported. Recently, we showed that introducing DOG into DOPC perturbed some properties of the bilayer (e.g., thickness and order parameter) and made an embedded amphipathic helix of the ALPS (Amphipathic-Lipid-Packing-Sensor) family more flexible compared to ALPS in pure DOPC (16). Bennett et al. (23) used potentials of mean force to determine the flip-flop barrier of palmitoyl-oleoyl-glycerol across a pure palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine (POPC) bilayer or across a model of liquid-ordered membrane. Finally, Alwarawrah et al. (24) reported

Submitted July 16, 2012, and accepted for publication November 16, 2012.

*Correspondence: patrick.fuchs@univ-paris-diderot.fr

Abbreviations: MD, molecular dynamics; DOPC, dioleoylphosphatidylcholine; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; DOG, dioleoylglycerol; DAG, diacylglycerol; ASA, accessible surface area.

Editor: Scott Feller.

© 2013 by the Biophysical Society
0006-3495/13/02/0585/9 \$2.00



<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3836>

simulations of dipalmitoylglycerol (DPG) within a POPC bilayer in presence or absence of cholesterol. DPG was shown to induce spaces between PC headgroups that did not localize above DPG but between the first and second nearest-neighbor PC headgroups of a DPG.

In this work, we use a combination of atomistic simulations and new, to our knowledge, geometrical tools to assess the physicochemical perturbations that are induced by the highly conical lipid DOG in a flat PC membrane (Fig. 1). We observe that although DOG increases the number and size of lipid-packing defects in the interfacial zone, the defects do not colocalize with the DOG molecules, suggesting global rather than local perturbations. Of importance, the defects induced by DOG strongly resemble those induced by positive curvature, which have been recently described by Voth and co-workers (25). This analogy explains why some peripheral proteins that use hydrophobic insertions and notably amphipathic helices of the ALPS family appear hypersensitive to both positive curvature and conical lipids (26). This latter aspect is further developed in an accompanying work (27).

METHODS

System setup

Four systems composed of a fully solvated (40 water molecules per lipid) lipid bilayer were considered in this study: three pure systems composed of DMPC, POPC, or DOPC lipids, and one mixed system containing DOPC and DOG lipids at a molar ratio of 85:15 (denoted DOPC/DOG

throughout this work). Note that DOG is tolerated in DOPC bilayers provided that its molar density does not exceed 15–20 mol % (28,29); beyond, its conical shape induces a transition to an inverted hexagonal phase (H_{II}). For each composition three different patches were used: 70 lipids, 128 lipids, and 280 lipids. The DOPC/DOG mixture was obtained by replacing the head of randomly chosen DOPC molecules by a hydroxyl group. We performed the same number of DOG substitutions in each leaflet. Each bilayer was then properly equilibrated for 100 ns before a production run of 100, 200, or 700 ns (Table S1 in the Supporting Material). For pure DOPC and DOPC/DOG, additional simulations of patches of 1024 lipids were performed (5 ns of equilibration and 195 ns of production).

Force field and simulation details

The Berger force field (30) was used for all lipids. In DOPC and DOG, the *cis*-double bond of each acyl chain was corrected as previously suggested (31,32). For DOG, our previous model (16) was used: its parameterization is entirely based on Berger except for the charge on the hydroxyl oxygen, which is set to -0.7 e (taken from OPLS-UA (33)). In the accompanying work, a peptide is simulated with the OPLS-AA force field (34) within lipid bilayers identical to those of this work. We thus directly used the half- ϵ double-pairlist OPLS method (35,36), so that our lipids are directly compatible with peptides/proteins simulated with OPLS-AA. For compatibility, the TIP3P water model (37) was used. Additionally, for the patches of 280 lipids only, 120 mM of ions (Na^+/Cl^-) were added to be consistent with the simulations of the companion work (containing a peptide) (27).

All simulations were performed using GROMACS 4.5.3 (38) within the NPT ensemble. All systems were equilibrated with the Berendsen thermostat at 300 K (with a time constant of 0.1 ps; lipids and water coupled separately) and the Berendsen barostat at 1 bar (with a time constant of 1 ps and a compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$) (39). Production runs were run at 300 K using the velocity-rescaling thermostat (40) (with a time constant of 0.1 ps, lipids and water coupled separately) and at 1 bar using the Parrinello-Rahman barostat (41) (with a time constant of 4 ps and a compressibility of $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$). Pressure coupling was applied semisotropically (x and y directions coupled, z direction scaled independently from x and y). Periodic boundaries were applied in all directions. Bond lengths were constrained using the P-LINCS algorithm (38). A time step of 2 fs was used with the leapfrog integrator. Trajectories were initiated by assigning a Maxwell-Boltzmann distribution of velocities at the chosen temperature. Water molecules were kept rigid using the SETTLE algorithm (42). Lennard-Jones interactions were cutoff at 1.0 nm. The smooth particle-mesh Ewald method (43,44) was used for evaluating electrostatic interactions, with a real space cutoff of 1.0 nm, a grid of 0.12 nm, and an interpolation order of 4. The neighbor list was updated every 10 steps. Frames were saved every 10 ps (100 ps for the big patches of 1024 lipids) for subsequent analysis. All molecular graphics were generated with VMD (45).

Analysis of bilayer properties

A number of classical analyses of membrane properties were conducted, including hydrophobic thickness, lateral diffusion, bending and area compressibility modulus, lateral pressure profile, and potential of mean force of lipids across the membranes. All details on these analyses are reported in the Supporting Material.

Packing defects mapping using ASA and a new Cartesian scheme

Packing defects were defined and evaluated in three ways: i), using an approach analogous to the one used by Voth and co-workers (25), and ii), using, to our knowledge, two new methods that we introduce in this work.

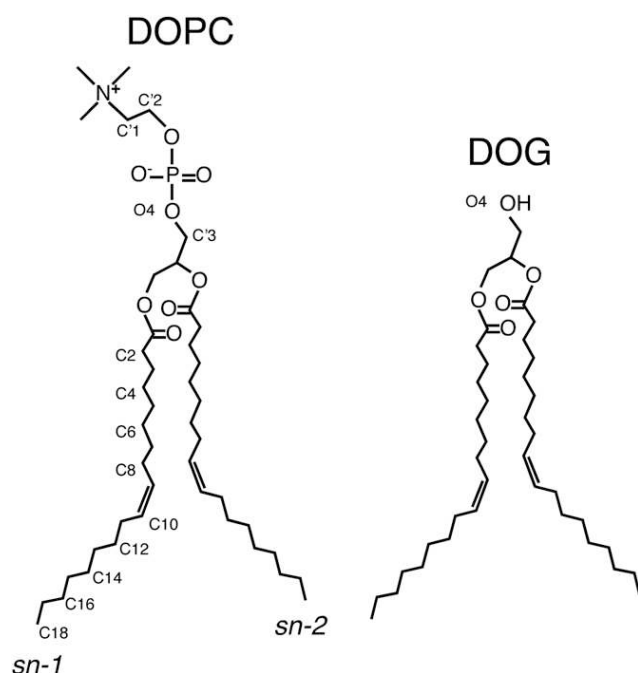


FIGURE 1 Structure of DOPC and DOG. Note that the double bond on each aliphatic tail is in a *cis* configuration. Each label below the phosphorous atom applies for both DOPC and DOG and for each aliphatic chain (*sn*-1 and *sn*-2).

The first method is based on the evaluation of the ASA of the bilayer aliphatic carbons. The ASA was evaluated on the two leaflets of 280 lipids with the program NACCESS (46) using a probe radius of 0.3 nm as done in (25). All the nonzero areas were then projected on the x - y plane and defined as defects (overlapping defects were merged into a single one).

Our new methods for evaluating packing defects consist in the following procedure. First, the plane perpendicular to the membrane normal was mapped into a grid of 0.1 nm resolution. For each grid point, we scanned the normal to the membrane plane starting from the solvent and descending up to 0.1 nm below the sn -2 carbon of the nearest glycerol. During the scanning procedure, solvent atoms were ignored and the analysis was done separately on each leaflet. At each z position of a given grid point, the presence of an eventual overlapping atom was evaluated by calculating a distance between the grid point center and the center of any atom of the bilayer. Overlap was assigned when this distance was shorter than the grid point diagonal half-length (0.07 nm) plus the van der Waals radius of the atom (see Fig. S1). Depending on the nature and depth of the first atom met during this scanning procedure (i.e., the first atom that overlaps with the grid point under consideration), we distinguished three cases: i), no defect when the atom was nonaliphatic; ii), chemical defect when the atom was an aliphatic carbon; iii), geometrical defect when the atom was an aliphatic carbon and was 0.1 nm below the sn -2 carbon of the nearest glycerol. Adjacent elementary points of similar nature were then merged, resulting in defects of various sizes. Note that geometrical defects are a subcategory of chemical defects. Further details on the two methods are given in the Supporting Material, notably the choice of van der Waals radii.

As noted previously by Voth and co-workers (25), the distribution of packing defect size falls off exponentially. For all methods, the area defect distribution was plotted on a semilog scale and fitted to an exponential decay: $p(A) = Be^{-kA}$, where $p(A)$ is the probability of finding a defect area of A nm², B is a constant, and k is the exponential decay in units of nm⁻². All points below 0.05 nm² were discarded from the fit (small defects tend to be similar whatever the composition). All probabilities strictly below 10^{-4} were also discarded because of their poor convergence.

RESULTS AND DISCUSSION

Does DOG directly create voids in the interfacial zone of DOPC bilayers?

Because DOPC and DOG differ solely by their polar heads (Fig. 1), one may naively assume that replacing some DOPC molecules by DOG in a bilayer will affect the atomic density in the polar head region, although leaving the hydrophobic region unaltered. In other words, a DOPC → DOG substitution should create a void or defect corresponding to the lack of phosphocholine. However, in previous MD simulations we and other groups reported a more complex picture (16,23,24). The critical point is that DOG (here used at 15 mol %) does not occupy the same position as DOPC, but, instead, slightly sinks toward the center of the bilayer. The different partitioning of DOG and DOPC is exemplified by two observations (Fig. 2). First, carbon 2 (C2) of DOG occupies a deeper (−0.2 nm) position than the corresponding atom of DOPC (compare the red and gray atoms in Fig. 2, *a* and *b*, and the dotted profiles in Fig. 2, *c* and *d*). Second, the density profile of DOG lacks the characteristic minimum at the border between the two leaflets that is observed for DOPC, thereby indicating that the aliphatic tails of DOG partially invade the bilayer center and interdigitate (compare the red and gray dotted lines in Fig. 2, *c* and *d*).

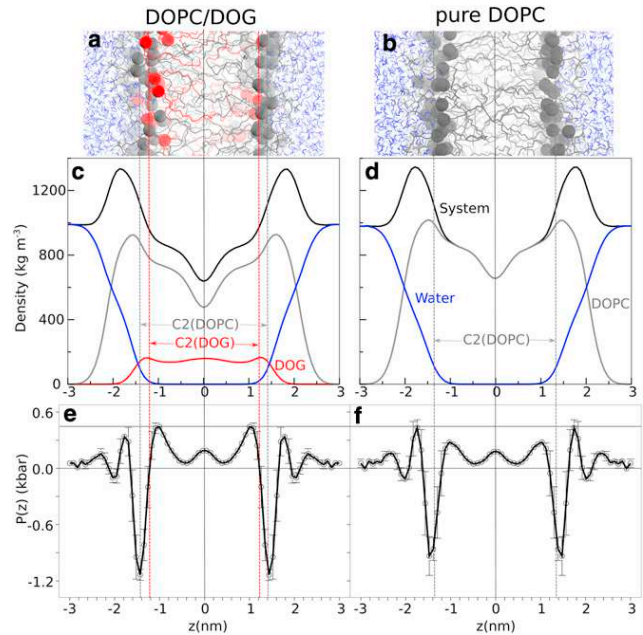


FIGURE 2 Cross-section analysis of DOPC/DOG and DOPC bilayers. The upper panels show snapshots of DOPC/DOG (85:15 mol:mol) (*a*) and pure DOPC (*b*) bilayers. All atoms are represented as wireframes except C2 atoms of DOPC and DOG, which are depicted as gray (DOPC) or red (DOG) spheres. The middle panels show density profiles for DOPC/DOG (*c*) and DOPC (*d*) bilayers with the density of the whole system in black, DOPC in gray, DOG in red, and water in blue. The vertical dotted lines coincide with the C2 carbons of DOPC (gray) and DOG (red); the vertical solid line corresponds to the center of the bilayer. The lower panels show the symmetrized lateral pressure profile (with error bars) of DOPC/DOG (*e*) and DOPC (*f*) bilayers. The vertical lines indicate the bilayer center as well as the C2 atoms of DOPC and DOG. Note that the density and pressure profiles indicate substantial changes between the two bilayers for the hydrophobic region but not for the polar region.

These observations suggest two conclusions. On the one hand, DOG should substantially affect the bulk properties of the bilayer. For example, an effect of DOG on the elastic properties of the membrane can be anticipated because the different partitioning of DOG and DOPC leads to an increase in membrane thickness (Table 1 and Fig. 2). On the other hand, how DOG affects the interfacial properties of the bilayer remains unclear. Notably, it is difficult to understand how DOG could create defects in the interfacial region while partitioning deeper than DOPC. Solving this second issue was the main motivation of this work and, as

TABLE 1 Structural, dynamic, and elastic properties of a pure DOPC and DOPC/DOG bilayer

	Pure DOPC	DOPC/DOG
Hydrophobic thickness h (nm)	2.63 ± 0.11	2.89 ± 0.08
DOPC diffusion coefficient D (10^{-8} cm ² s ⁻¹)	8.8 ± 1.1	8.7 ± 0.8
Compressibility K_A (N m ⁻¹)	0.331 ± 0.006	0.351 ± 0.027
Bending modulus κ (kT)	21.4 ± 0.6	14.3 ± 1.4

explained later, requires new analytical methods. Before presenting these new approaches, the next two sections summarize other general observations that can be extracted from a classical analysis of DOPC and DOPC/DOG simulations and which give information about the physical properties of such bilayers. Additional analysis is also presented in the [Supporting Material](#), including evaluations of the DOPC and DOG area and volumes ([Fig. S2](#) and [Fig. S3](#)), as well as determination of the hydration of the phosphate groups in DOPC/DOG and DOPC bilayers. As expected, DOG ([Fig. 1](#)) leads to a slightly higher hydration of the membrane polar region because oxygen O4 can act both as a hydrogen bond donor and acceptor, in contrast to oxygen O4 of DOPC, which acts only as a hydrogen bond acceptor ([Fig. S4](#)).

The changes in the lateral pressure profile induced by DOG in the polar head region are marginal

An alternative method to analyze the cross section of a bilayer is to compute the lateral pressure profile $P(z)$ along its normal ([13](#)). A typical $P(z)$ profile shows a sharp negative peak corresponding to the cohesive interfacial tension at the hydrophilic/hydrophobic interface. This peak is flanked by two positive peaks at the level of the polar headgroups (electrostatic and steric interactions, hydration repulsion) and aliphatic chains (steric interactions) ([47](#)). Thus, $P(z)$ gives the tendency of each region to shrink or to expand and has been proposed to be a valuable parameter to assess the effect of conical lipids on the membrane surface; the prediction is that a conical lipid should reduce the pressure at the polar head region, hence facilitating protein adsorption ([13](#)).

As shown in [Fig. 2, e](#) and *f*, the most noticeable effect of DOG on the lateral pressure profile of a DOPC bilayer is a twofold increase of the positive peak at the level of the aliphatic tails (at ± 1.2 nm). This peak corresponds, on average, to carbons C8 and C2 of the oleoyl chain of DOPC and DOG, respectively. Surprisingly and in contrast to what has been predicted ([13](#)), this increase is insufficiently counterbalanced by a decrease in the lateral pressure in the polar head region (around ± 2.0 nm). In fact, the pressure decrease in this region is quite modest (within the error bars of our measurements) and cannot counteract the pressure increase in the aliphatic region. Instead, the overall pressure of the DOPC/DOG system is kept at zero by a further drop in the cohesive interfacial tension.

Because lateral pressure profiles and bilayer elastic properties are connected ([47,48](#)), we expected a change in rigidity and/or compressibility of the bilayer upon DOG addition. [Table 1](#) shows the area compressibility and bending modulus of the two lipid compositions. The addition of DOG in DOPC decreases the bending modulus of the bilayer by 35% (from 21.4 to 14.3 kT) but does not significantly change its compressibility modulus. It is inter-

esting to note that an increase in bilayer thickness is generally associated with an increase in bending rigidity ([49](#)) (e.g., 20.5 ± 2.4 kT and 29.0 ± 3.6 kT for diC18:1_{c9} and diC22:1, respectively). However in our case, the increase in membrane thickness does not result from an increase in acyl chain length but from the different partitioning of the two lipids in the bilayer as well as an increase of order parameter of DOPC acyl chains ([16](#)). We conclude that the different partitioning of DOG and DOPC along the membrane normal facilitate rather than impede membrane deformations.

Dynamic properties of mixed DOPC/DOG bilayers

We then evaluated the propensity of DOG and DOPC to flip-flop between leaflets. Evaluation of transbilayer movements is important in the context of defects in lipid packing: a translocating lipid should create transient perturbations in the bilayer and, conversely, a bilayer with lipid packing defects could favor flip-flop movements. However, no flip-flop of DOG and DOPC could be observed in our simulations, whose cumulative length amounted to a few microseconds. In contrast, we observed normal lateral diffusion of DOPC, which was essentially unaffected by the introduction of DOG ([Table 1](#)). Of note, Alwarawrah et al. ([24](#)) found that DPG reduces lateral diffusion of POPC within a POPC/DPG mixture, suggesting that the saturated chains of DPG but not the monounsaturated chains of DOG affect the lateral movements of PC molecules.

We determined the PMF for moving the headgroup of DOG or DOPC into the center of a pure DOPC bilayer or a DOPC/DOG bilayer. As shown in [Fig. 3](#), DOPC and DOG retain the same energy profile in both compositions, suggesting that DOG, at 15 mol %, does not favor flip-flop movements. Note the slight shift between the curves, which is due to the difference in thickness between DOPC

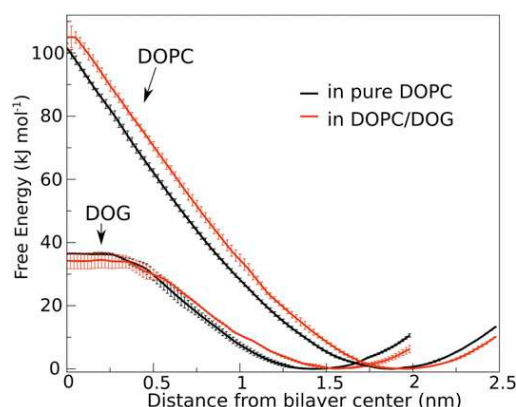


FIGURE 3 Potentials of mean force for transferring the headgroup of DOPC and DOG from water to the center of a pure DOPC or DOPC/DOG bilayer. For each PMF, the position restraint was placed on the hydroxyl or phosphate of the headgroup (for DOG and DOPC, respectively) and used to determine the x axis. The PMFs are shown with error bars.

and DOPC/DOG bilayers, and the flatness of the energy profile in the bilayer center for DOG, which indicates that its translocation is accompanied by dehydration (i.e., as opposed to DOPC, there is no need to form a water pore to translocate DOG across the bilayer, see Fig. S5). The energy barrier for moving DOPC and DOG to the center of the bilayer was 100 and 35 kJ/mol, respectively. From these values, we estimate (23,50) the half-time of DOPC and DOG flip-flop to be ~ 30 min and $100 \mu\text{s}$, respectively; values that are well above the timescale of our simulations and in good agreement with previous MD simulations of palmitoyl-oleoyl-glycerol in POPC (23). We conclude from this analysis that transbilayer movements are unlikely to contribute to lipid packing defects induced by DOG.

DOG incorporation increases occurrence and size of packing defects at the hydrophilic/hydrophobic interface

The previous analyses give a time-averaged picture of the cross section of DOPC and DOPC/DOG bilayers. However, for a peripheral protein initially in the solvent, what should be more important is the instantaneous structure of the membrane surface: does it display defects at any given time and are these defects deep and large enough to facilitate protein adsorption? Therefore, we need to change our point of view by 90° and consider the structure of DOPC and DOPC/DOG membranes from the top to look at their microscopic details.

To do so, we use three methods (Fig. 4). The first approach is similar to that introduced by Voth and co-workers (25) and is based on the evaluation of the ASA of the bilayer aliphatic carbons using a spherical probe of 0.3 nm in radius (approximately the size of a bulky residue) (see Fig. 4 b). The second and third approaches are based on a Cartesian scheme (see

Fig. S1). First, the bilayer surface is mapped into a grid (x, y) whose pixels have a surface area of 0.01 nm^2 . For each pixel, we scan the normal to the membrane plane (z) from the solvent toward the center of the bilayer. We define two types of lipid packing defects: i), chemical defects, when the first atom that is met along the normal is an aliphatic carbon (Fig. 4 c); and ii), geometrical defects, when the first atom that is met is an aliphatic carbon and it is 0.1 nm below the *sn*-2 carbon of the nearest glycerol (Fig. 4 d). Thus, geometrical defects are a subcategory of chemical defects; the former correspond to voids in the bilayer, whereas the latter correspond to regions where aliphatic chains are exposed to the solvent (see schemes in Fig. 4).

The different panels of Fig. 4 show top views of DOPC/DOG and DMPC bilayers with defects as revealed by the ASA method (Fig. 4 b) and by our Cartesian scheme for both chemical (Fig. 4 c) and geometrical (Fig. 4 d) defects. These various representations immediately suggest that, whatever the method used, the lipid packing defects are more abundant and larger in DOPC/DOG than in DMPC bilayers, two extreme cases in terms of lipid packing.

Similar analyses were performed on thousands of snapshots of DMPC, POPC, DOPC, and DOPC/DOG bilayers, leading to the statistical analysis shown in Fig. 5. For all lipid compositions, the distribution of defects follows roughly a single exponential function above a threshold value of 0.05 nm^2 (below this value, all bilayers display the same distribution). As noted previously, all distributions suggest a second regime (which does not follow a pure exponential decay) for very large defects (25). Of importance, the exponential decay constant decreases when saturated acyl chains are replaced by monounsaturated ones and when DOG was introduced in the bilayer; the probability of occurrence of large defects follows the order: DMPC < POPC < DOPC < DOPC/DOG. The three methods agree

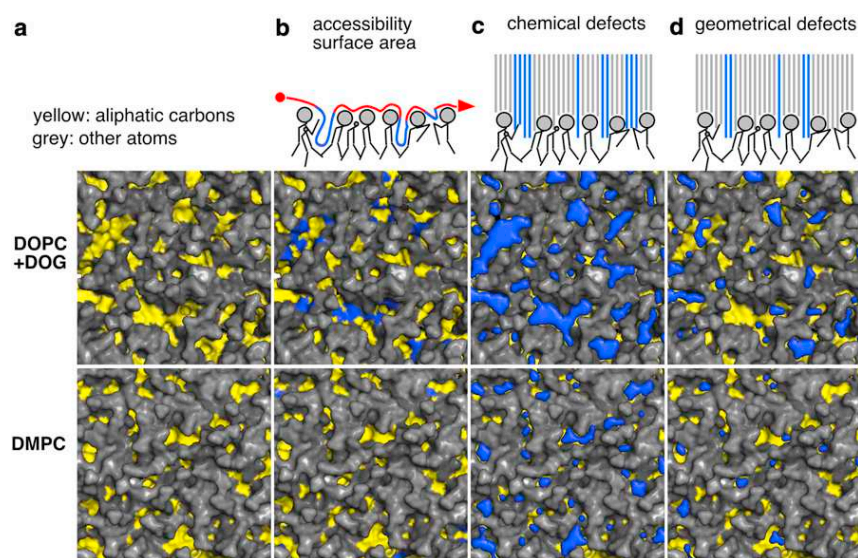


FIGURE 4 Detection of lipid packing defects. The three methods to identify packing defects in the interfacial zone of model membranes are schematized in the top row. The other panels show snapshots of the surface of DOPC/DOG and DMPC bilayers with polar heads in gray and aliphatic carbon atoms in yellow. For each composition, the columns are arranged as follows: (a) the pure bilayer; (b) the bilayer with the packing defects (blue) computed with the ASA method; (c and d) the bilayer with the chemical (c) or geometrical (d) defects (blue) computed with our new Cartesian scheme. The ASA method uses of a probe of 0.3 nm in radius and maps the accessible aliphatic carbon atoms. The Cartesian schemes probe the bilayer vertically by squares of 0.01 nm^2 and look for all accessible aliphatic carbon atoms (chemical defects) or only those that are below the glycerol level (geometrical defects). See text for further details.

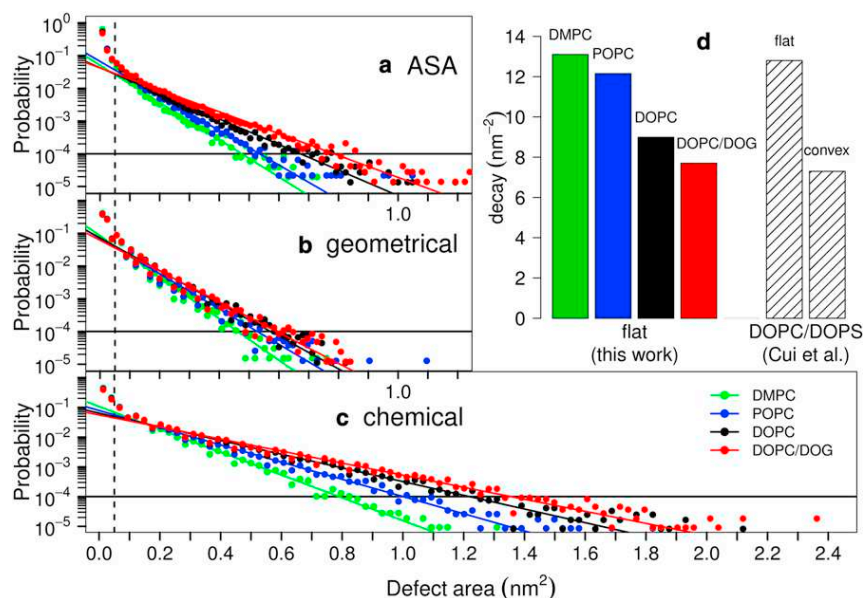


FIGURE 5 Size distribution of packing defects in model membrane systems. The various plots show the probability of finding a defect of defined size as obtained by the ASA method (*a*; like in (25)) or by the Cartesian schemes for geometrical (*b*) or chemical (*c*) defects. The color code is as follows: green, DMPC; blue, POPC; black, DOPC; red, DOPC/DOG. Each solid line is a fit to an exponential distribution for defects larger than 0.05 nm^2 and with probability $\geq 10^{-4}$. The fits give the following decay constants (in units of nm^{-2}) for DMPC, POPC, DOPC, and DOPC/DOG, respectively: (*a*) 13.1, 12.1, 9.0, and 7.7; (*b*) 14.6, 12.4, 11.5, and 10.8; (*c*) 8.8, 6.7, 5.3, and 4.7. The decay constants obtained in panel (*a*) are plotted in panel (*d*) and compared to those obtained by Cui et al. (25) on a DOPC/DOPS patch either in a flat or in a convex conformation.

remarkably well on this trend, but they identify defects of different sizes. Chemical defects essentially correspond to all regions where aliphatic atoms are visible from the membrane surface, regardless of their depth (compare Fig. 4, *a* and *c*). Geometrical defects are smaller because of their more restrictive definition (Fig. 4 *d*). Finally, the ASA method detects defects of medium size (Fig. 4 *b*) but the results depend on the choice of the probe radius (here 0.3 nm like in (25)); changing this value results in different defect areas. The main advantage of the ASA approach is that it is not sensitive to the orientation of the defects because the probe does not follow a preferential direction, whereas our Cartesian-based approach detects a vertical defect more readily than an oblique one because the membrane is scanned along its normal. The Cartesian-based approach combines two advantages: a fine resolution (0.1 nm) without the need to tune a probe size and the possibility to identify defects not only by their chemistry, but also by their depth. In the accompanying work (27), we show that geometrical defects, which closely resemble voids, are crucial for the partitioning of peptides that use hydrophobic insertions.

Packing defects induced by DOG incorporation or by positive curvature are similar

Because incorporating conical lipids into a flat membrane or imposing positive curvature represent two alternative ways to promote the binding of some peripheral proteins (9,14,15), we next wanted to compare the packing defects associated with these two different conditions. As shown in Fig. 5 *d*, the change in defect size distribution when going from a flat DMPC to a flat DOPC/DOG membrane (this study) closely matches the change in defect size distribution

observed by Voth and co-workers (25) when going from a flat DOPC/DOPS to a convex (radius = 20 nm) DOPC/DOPS membrane. This comparison suggests that the structure of the interfacial zone of a convex membrane strongly resembles that of a flat membrane containing conical lipids. In line with this hypothesis, the two types of bilayers share other features. In bilayers containing conical lipids or displaying positive curvature, the lipid polar heads are more disordered and solvent accessible, whereas the acyl chains are more ordered (16,51). This analogy has, however, some limitations. Notably, bending a membrane is generally associated with a decrease in membrane thickness (51), whereas incorporating a conical lipid induces membrane thickening (Fig. 2, Table 1). Thus, a membrane containing conical lipids is a good mimetic of a curved membrane for the interfacial zone, not for the central region.

It seems obvious that packing defects induced by membrane curvature should be evenly distributed on the bilayer surface. In contrast, DOG-induced defects may colocalize with the conical lipids themselves. To assess this second possibility, we evaluated the overlap between packing defects and the acyl chains of the DOG or DOPC lipids (Table 2). For this, we first determined the relative surfaces occupied by DOG and DOPC acyl chains. For each surface, we then determined the fraction of area that is occupied by lipid packing defects. Strikingly and as shown in Table 2, this fraction was not significantly higher in the DOG area than in the DOPC area. Therefore, geometrical and chemical packing defects are evenly distributed on a flat DOPC/DOG bilayer and do not colocalize with DOG although DOG favors the formation of defect. We conclude that incorporation of DOG lipids into a flat DOPC bilayer mimics the effect of inducing a positive curvature because the spatial localization of the conical lipids inside the

TABLE 2 Spatial distribution of packing defects in a DOPC/DOG bilayer

Nature of packing defects	DOG (%) ^a	DOPC (%) ^b
Geometrical	1.4 ± 0.5	1.7 ± 0.4
Chemical	5.4 ± 1.3	5.4 ± 0.7

After determination of the relative surfaces occupied by DOG and by DOPC acyl chains, we determined the percentage of each surface that corresponds to chemical or geometrical packing defects. In this analysis, we retain only defects larger than 0.1 nm². The obtained values show that packing defects are not enriched in the surface occupied by DOG compared to DOPC (the distributions overlap, see Figure S6). A snapshot illustrating this idea is shown in Figure S7.

^aFraction of area occupied by packing defects within the total area of DOG lipids.

^bFraction of area occupied by packing defects within the total area of DOPC lipids.

bilayer rapidly becomes uncorrelated with packing defects (packing defects are highly dynamic objects and have short life times around 10–100 ps), which are thus ubiquitous and randomly distributed on the bilayer surface.

CONCLUSIONS

The concept of lipid packing defects has been instrumental to explain some observations on peripheral proteins. In brief, it is assumed that voids in the membrane interfacial zone, which are induced either by positive curvature or by conical lipids, act as binding sites for exposed hydrophobic residues of the protein (1,9,13,52). However, this picture remains elusive at the atomic level. First, the flexibility and movements of lipid molecules could attenuate the geometrical defects. Second, the analogy between defects induced by positive curvature and defects induced by conical lipids is deceptively simple. Imposition of a positive curvature necessarily affects all lipid molecules (like in a fan), whereas introduction of conical lipids may have a more local effect.

Here we show that, as far as the surface structure of the membrane is concerned, there is a striking similarity between the defects induced by conical lipids and by positive curvature. This similarity arises from the fact that conical lipids do not induce defects at their exact location but instead impose a stress over the entire membrane surface that leads to defects of various sizes, randomly distributed over the surface.

In a physiological context, this finding is important because it suggests that large lipid packing defects may be restricted to membranes of the early secretory pathway. Indeed, not only do these organelles exhibit regions of high curvatures (such as the tubules of the endoplasmic reticulum or the transport vesicles of the Golgi apparatus), but also their bulk lipid composition is favorable for the formation of large defects (unlike the bulk composition of late secretory membranes) (9). Studies in yeast suggest that several lipid metabolic pathways that desaturate the

acyl chains or modulate the sizes of the polar head groups maintain a high ratio between conical and nonconical lipids in these organelles as compared to the plasma membrane (53–55).

A second important implication of the analogy between the packing defects induced by conical lipids and by membrane curvature concerns MD simulations. Performing all-atom simulations on curved membranes requires high computational resources and poses issues such as establishing simple periodic conditions. In contrast, simulations on small flat membrane patches are more amenable to simulations. In the case of sensors of membrane curvature that use hydrophobic insertions, performing simulations on flat membranes containing conical lipids should help to dissect the mechanism of membrane adsorption. In the accompanying work (27), we use this approach to study how ALPS motifs sense packing defects in membranes.

SUPPORTING MATERIAL

Supplementary methods, figures, table, and references (56–64) are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(12\)05142-9](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(12)05142-9).

We thank Luca Monticelli for having provided the topology of DOPC as well as the coordinates of a DOPC bilayer, Samuli Ollila for useful discussions on the lateral pressure profile, and Alenka Copic for comments on the manuscript. This work was granted access to the HPC resources of CINES under the allocation c2011-076720 and c2012-076720 made by GENCI (Grand Equipement National de Calcul Intensif).

This work was supported by the Swiss National Science Foundation grant PBELP3_141118 (to S.V.), by the French Government grant MENRT (to L.V.), and by an ERC advanced grant 268888 (to B.A.). DPT is an Alberta Innovates Health Solutions (AIHS) Scientist and Alberta Innovates Technology Futures Strategic Chair in (Bio)Molecular Simulation. D.W.B. was supported by studentships from AIHS and the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC; Canada). Work in DPT's group is supported by NSERC. Some calculations were carried out on Compute Canada facilities.

REFERENCES

1. Epand, R. M. 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1376:353–368.
2. van Meer, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:112–124.
3. Farsad, K., and P. De Camilli. 2003. Mechanisms of membrane deformation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:372–381.
4. McMahon, H. T., and J. L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 438:590–596.
5. Baumgart, T., B. R. Capraro, ..., S. L. Das. 2011. Thermodynamics and mechanics of membrane curvature generation and sensing by proteins and lipids. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 62:483–506.
6. Antonny, B. 2006. Membrane deformation by protein coats. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:386–394.
7. Bretscher, M. S., and S. Munro. 1993. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*. 261:1280–1281.

8. Chernomordik, L. V., and M. M. Kozlov. 2003. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:175–207.
9. Antonny, B. 2011. Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annu. Rev. Biochem.* 80:101–123.
10. Madsen, K. L., V. K. Bhatia, ..., D. Stamou. 2010. BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same mechanism to sense membrane curvature. *FEBS Lett.* 584:1848–1855.
11. Attard, G. S., R. H. Templer, ..., S. Jackowski. 2000. Modulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by membrane curvature elastic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:9032–9036.
12. Davies, S. M., R. M. Epan, ..., R. B. Cornell. 2001. Regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase activity by the physical properties of lipid membranes: an important role for stored curvature strain energy. *Biochemistry.* 40:10522–10531.
13. van den Brink-van der Laan, E., J. A. Killian, and B. de Kruijff. 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666:275–288.
14. Antonny, B., I. Huber, ..., D. Cassel. 1997. Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* 272:30848–30851.
15. Bigay, J., P. Gounon, ..., B. Antonny. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature.* 426:563–566.
16. González-Rubio, P., R. Gautier, ..., P. F. Fuchs. 2011. Amphipathic-Lipid-Packing-Sensor interactions with lipids assessed by atomistic molecular dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808:2119–2127.
17. Hatzakis, N. S., V. K. Bhatia, ..., D. Stamou. 2009. How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nat. Chem. Biol.* 5:835–841.
18. Cooke, I. R., and M. Deserno. 2006. Coupling between lipid shape and membrane curvature. *Biophys. J.* 91:487–495.
19. Derganc, J. 2007. Curvature-driven lateral segregation of membrane constituents in Golgi cisternae. *Phys. Biol.* 4:317–324.
20. Kamal, M. M., D. Mills, ..., J. Howard. 2009. Measurement of the membrane curvature preference of phospholipids reveals only weak coupling between lipid shape and leaflet curvature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:22245–22250.
21. Sorre, B., A. Callan-Jones, ..., P. Bassereau. 2009. Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:5622–5626.
22. Tian, A., and T. Baumgart. 2009. Sorting of lipids and proteins in membrane curvature gradients. *Biophys. J.* 96:2676–2688.
23. Bennett, W. F. D., and D. P. Tieleman. 2012. Molecular simulation of rapid translocation of cholesterol, diacylglycerol, and ceramide in model raft and nonraft membranes. *J. Lipid Res.* 53:421–429.
24. Alwarawrah, M., J. Dai, and J. Huang. 2012. Modification of Lipid Bilayer Structure by Diacylglycerol: A Comparative Study of Diacylglycerol and Cholesterol. *J. Chem. Theory Comput.* 8:749–758.
25. Cui, H., E. Lyman, and G. A. Voth. 2011. Mechanism of membrane curvature sensing by amphipathic helix containing proteins. *Biophys. J.* 100:1271–1279.
26. Drin, G., J. F. Casella, ..., B. Antonny. 2007. A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:138–146.
27. Vanni, S., L. Vamparys, ..., B. Antonny. 2013. Amphipathic Lipid Packing Sensor Motifs: Probing Bilayer Defects with Hydrophobic Residues. *Biophys. J.* 104:575–584.
28. Das, S., and R. P. Rand. 1986. Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry.* 25:2882–2889.
29. Orädd, G., G. Lindblom, ..., H. Ljusberg-Wahren. 1995. Phase diagram of soybean phosphatidylcholine-diacylglycerol-water studied by x-ray diffraction and ³¹P- and pulsed field gradient ¹H-NMR: evidence for reversed micelles in the cubic phase. *Biophys. J.* 68:1856–1863.
30. Berger, O., O. Edholm, and F. Jähnig. 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72:2002–2013.
31. Bachar, M., P. Brunelle, ..., A. Rauk. 2004. Molecular dynamics simulation of a polyunsaturated lipid bilayer susceptible to lipid peroxidation. *J. Phys. Chem. B.* 108:7170–7179.
32. Martinez-Seara, H., T. Róg, ..., I. Vattulainen. 2008. Influence of *cis* double-bond parametrization on lipid membrane properties: how seemingly insignificant details in force-field change even qualitative trends. *J. Chem. Phys.* 129:105103.
33. Jorgensen, W. L. 1986. Optimized intermolecular potential functions for liquid alcohols. *J. Chem. Phys.* 90:1276–1284.
34. Jorgensen, W. L., D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives. 1996. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 118:11225–11236.
35. Chakrabarti, N., C. Neale, ..., R. Pomès. 2010. An iris-like mechanism of pore dilation in the CorA magnesium transport system. *Biophys. J.* 98:784–792.
36. Tieleman, D. P., J. L. MacCallum, ..., L. Monticelli. 2006. Membrane protein simulations with a united-atom lipid and all-atom protein model: lipid-protein interactions, side chain transfer free energies and model proteins. *J. Phys. Condens. Matter.* 18:S1221–S1234.
37. Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, ..., M. L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79:926–935.
38. Hess, B. 2008. P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4:116–122.
39. Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, ..., J. R. Haak. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81:3684–3690.
40. Bussi, G., D. Donadio, and M. Parrinello. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126:014101–014107.
41. Parrinello, M., and A. Rahman. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52:7182–7190.
42. Miyamoto, S., and P. A. Kollman. 1992. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* 13:952–962.
43. Darden, T., D. York, and L. Pedersen. 1993. Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98:10089–10092.
44. Essmann, U., L. Perera, ..., L. Pedersen. 1995. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103:8577–8593.
45. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Grap.* 14:33–38, 27–38.
46. Hubbard, S. J., and J. M. Thornton. 1993. NACCESS. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, London, UK.
47. Ollila, S., M. T. Hyvönen, and I. Vattulainen. 2007. Polyunsaturation in lipid membranes: dynamic properties and lateral pressure profiles. *J. Phys. Chem. B.* 111:3139–3150.
48. Ollila, O. H. S., H. J. Risselada, ..., S. J. Marrink. 2009. 3D pressure field in lipid membranes and membrane-protein complexes. *Phys. Rev. Lett.* 102:078101.
49. Rawicz, W., K. C. Olbrich, ..., E. Evans. 2000. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* 79:328–339.
50. Bennett, W. F. D., J. L. MacCallum, and D. P. Tieleman. 2009. Thermodynamic analysis of the effect of cholesterol on dipalmitoylphosphatidylcholine lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 131:1972–1978.
51. Risselada, H. J., and S. J. Marrink. 2009. Curvature effects on lipid packing and dynamics in liposomes revealed by coarse grained molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11:2056–2067.

52. Bhatia, V. K., N. S. Hatzakis, and D. Stamou. 2010. A unifying mechanism accounts for sensing of membrane curvature by BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:381–390.
53. Boumann, H. A., J. Gubbens, ..., A. I. de Kroon. 2006. Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote. *Mol. Biol. Cell.* 17: 1006–1017.
54. Mousley, C. J., K. R. Tyeryar, ..., V. A. Bankaitis. 2007. The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771:727–736.
55. Schneider, R., B. Brügger, ..., S. D. Kohlwein. 1999. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 146:741–754.
56. Edholm, O., and J. F. Nagle. 2005. Areas of molecules in membranes consisting of mixtures. *Biophys. J.* 89:1827–1832.
57. Wohrlert, J., and O. Edholm. 2006. Dynamics in atomistic simulations of phospholipid membranes: Nuclear magnetic resonance relaxation rates and lateral diffusion. *J. Chem. Phys.* 125:204703.
58. Kumar, S., J. M. Rosenberg, ..., P. A. Kollman. 1992. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* 13:1011–1021.
59. Ollila, O. H. S. 2010. Lateral pressure in lipid membranes and its role in function of membrane proteins. PhD thesis. Tampere University of Technology, Finland.
60. Waheed, Q., and O. Edholm. 2009. Undulation contributions to the area compressibility in lipid bilayer simulations. *Biophys. J.* 97:2754–2760.
61. Helfrich, W. 1973. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C.* 28:693–703.
62. Brandt, E. G., A. R. Braun, ..., O. Edholm. 2011. Interpretation of fluctuation spectra in lipid bilayer simulations. *Biophys. J.* 100:2104–2111.
63. Lindahl, E., and O. Edholm. 2000. Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* 79:426–433.
64. Schrodinger, L. 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.

Amphipathic Lipid Packing Sensor Motifs: Probing Bilayer Defects with Hydrophobic Residues

Stefano Vanni,[†] Lydie Vamparys,^{‡§¶} Romain Gautier,[†] Guillaume Drin,[†] Catherine Etchebest,^{‡§¶} Patrick F. J. Fuchs,^{‡§¶} and Bruno Antony^{†*}

[†]Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia-Antipolis and Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7275, Valbonne, France; [‡]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U665, Paris, France;

[§]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité Mixte de Recherche S665, Paris, France; and [¶]Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris, France

ABSTRACT Sensing membrane curvature allows fine-tuning of complex reactions that occur at the surface of membrane-bound organelles. One of the most sensitive membrane curvature sensors, the Amphipathic Lipid Packing Sensor (ALPS) motif, does not seem to recognize the curved surface geometry of membranes *per se*; rather, it recognizes defects in lipid packing that arise from membrane bending. In a companion paper, we show that these defects can be mimicked by introducing conical lipids in a flat lipid bilayer, in agreement with experimental observations. Here, we use molecular-dynamics (MD) simulations to characterize ALPS binding to such lipid bilayers. The ALPS motif recognizes lipid-packing defects by a conserved mechanism: peptide partitioning is driven by the insertion of hydrophobic residues into large packing defects that are preformed in the bilayer. This insertion induces only minor modifications in the statistical distribution of the free packing defects. ALPS insertion is severely hampered when monounsaturated lipids are replaced by saturated lipids, leading to a decrease in packing defects. We propose that the hypersensitivity of ALPS motifs to lipid packing defects results from the repetitive use of hydrophobic insertions along the monotonous ALPS sequence.

INTRODUCTION

In early reconstitution experiments on liposomes, it was observed that the activity of the peripheral protein Arf GTPase-Activating Protein 1 (ArfGAP1) increased >2 orders of magnitude when conical lipids were introduced at the expense of cylindrical lipids in the bilayer (1). Later, an effect of similar amplitude was observed when the lipid composition was kept constant while the liposome radius was decreased from 150 to 30 nm (2). These two observations led to a model in which ArfGAP1 senses the packing defects between lipid molecules that arise from the mismatch between the actual curvature of the membrane and the lipid geometry.

Since then, this model has gained more interest. First, membrane curvature is recognized as an efficient index to control several biochemical reactions on membrane surfaces in space and time (3–8). In the case of ArfGAP1, its hypersensitivity to membrane curvature helps to organize two reactions: the assembly-disassembly cycle of the Coat Protein complex I (COPI) coat, a complex that shapes Golgi membranes into small transport vesicles, and the attachment of such vesicles by long tether proteins (2,9). Second, the motif by which ArfGAP1 recognizes membrane curvature has not only been identified (10,11) but has also been found in proteins with different functions, such as membrane tethers, nucleoporins, and lipid transporters (11–15). This motif is called the Amphipathic Lipid Packing Sensor (ALPS) motif.

ALPS motifs are sequences of 20–40 amino acids that, despite weak sequence identity, share similar physicochemical features (10,11). They contain hydrophobic residues that are regularly distributed every three or four residues, with a marked preference for bulky ones (e.g., Phe, Leu, and Trp). In between, small polar residues, notably Gly, Ser and Thr, are abundant, whereas charged residues are rare if not absent. ALPS motifs are intrinsically soluble but bind efficiently to liposomes that contain conical lipids (i.e., dioleoylglycerol) or display a highly positive curvature. Circular dichroism (CD) spectroscopy has shown that membrane adsorption of ALPS is accompanied by its folding into an α -helix (10,11,16), and molecular-dynamics (MD) simulations performed on the ALPS motif of ArfGAP1 in its membrane-embedded helical conformation suggested that its secondary structure is less stable than traditional amphipathic helices (17). Nevertheless, the molecular details of the interaction between ALPS motifs and biological membranes remain elusive because of the dual difficulty of performing structural studies on an intrinsically unfolded sequence and in a membrane environment. In particular, we still lack a thorough description of peptide partitioning into membranes, as well as a molecular understanding of how the specific amino acid composition of the peptide gives rise to its peculiar function as a curvature sensor.

The current model for sensing of membrane curvature by ALPS motifs posits that bulky hydrophobic residues serve as probes to detect the defects in lipid packing that arise from membrane bending (4,10,11,17). This mode of

Submitted June 27, 2012, and accepted for publication November 16, 2012.

*Correspondence: antony@ipmc.cnrs.fr

Editor: Scott Feller.

© 2013 by the Biophysical Society
0006-3495/13/02/0575/10 \$2.00



<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3837>

membrane curvature recognition, which is based solely on the hydrophobic effect, seems very different from that of well-folded domains such as BAR, which recognize membrane curvature via a complementary shape between their concave basic surface and convex acidic membranes (3,18). More generally, defects in lipid packing can be an asset for the adsorption of several peripheral proteins (e.g., α -synuclein), as well as for the functioning of transmembrane proteins (19–21).

To understand the hypersensitivity of the ALPS motif to membrane curvature and lipid geometry, it is necessary to address the differences, at the molecular level, between membranes that are abundant or scarce in packing defects. In a pioneering study, Voth and colleagues (22) characterized the packing defect distribution in anionic lipid bilayers of different curvatures by analyzing their accessible surface area (ASA). The size distribution of packing defects depends nontrivially on the curvature, and falls off exponentially with a characteristic constant that depends on curvature. In a companion study, we performed the same analysis on bilayers that contain lipids with different numbers of monounsaturated acyl chains and with or without the conical lipid dioleoylglycerol (23). Remarkably, using either the ASA approach or a new method based on Cartesian coordinates, we obtained a similar result: the size distribution of packing defects showed an exponential decay that depends on the number of monounsaturated acyl chains or on the introduction of conical lipids (23). Thus, inducing positive curvature and introducing conical lipids in a flat bilayer are two alternative ways to increase the occurrence of large lipid packing defects.

In this work, we explored the specific mechanism that couples the adsorption of ALPS motifs on the bilayer surface to lipid packing defects. We conducted MD simulations of the binding of the ALPS motifs of ArfGAP1 and GMAP210 to a lipid bilayer that is rich in packing defects. By simultaneously monitoring the interaction of the peptide with the bilayer and the localization and size of packing defects, we were able to show that the ALPS motif partitions in the bilayer via the insertion of hydrophobic residues into large preexisting packing defects that can be thought of as dynamical binding pockets for the inserting residues. The repetitive use of this elementary mode of membrane insertion along the monotonous ALPS sequence may explain the hypersensitivity shown by ALPS motifs to positively curved membranes.

MATERIALS AND METHODS

MD simulations

Two peptides were studied in this work. The first one was the first ALPS motif of ArfGAP1 (amino acids 197–231, sequence DDFLNSAMSSLYSGWSSFTTGASKFASAAKEGATK) (10,16,17). The N- and C-termini were acylated and aminated, respectively. Amino acids were numbered from 2 to 36, in agreement with previous literature (17). Thus, F26 in the

peptide corresponds to F222 in ArfGAP1. The second peptide was the ALPS motif of GMAP210 (amino acids 1–38, sequence MSSWLGG LGSLGQSLGQVGGSLASLTGQISNFTKDML). To faithfully model the peptide that has been studied experimentally (11), the N- and C-termini were in their default protonation state.

The peptides were modeled as a complete α -helix and then solvated in a box of water of $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$ with charge-neutralizing counterions using periodic boundary conditions. Several replicas of the system were run for 50 ns, and unfolding of the peptide into a molten-globule state was observed after ~ 10 ns in all simulations. For each system, one of the final structures was used as a starting point for the peptide-membrane simulations. The two lipid bilayers used in this study were a patch of 250 dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) lipids of area $9 \times 9 \text{ nm}^2$ and a patch of 240 dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and 40 dioleoylglycerol (DOG) lipids (molar ratio 85:15) of area $9.5 \times 9.5 \text{ nm}^2$. The two bilayers were equilibrated by performing 100 ns of MD in a water box containing Na^+ and Cl^- ions at physiological concentration (120 mM). The final bilayer structures were used to start the simulations with the peptide. All peptide-bilayer simulations were initiated by placing the unfolded peptide at a distance of 2.5 nm from the lipid bilayer. Water molecules that spatially overlapped with the peptide, as well as excess ions, were removed to keep the overall system charge at zero. Each replica (five for ArfGAP1 with DOPC/DOG, five for ArfGAP1 with DMPC, five for GMAP210 with DOPC/DOG, and five for GMAP210 with DMPC) was started from the same conformation by assigning different random velocities. On average, the total number of atoms was 65,000 in a box of $9.5 \times 9.5 \times 10 \text{ nm}^3$. All replicas were run for 400 ns, with the exception of two MD runs of ArfGAP1 with DOPC/DOG and two MD runs of GMAP210 with DOPC/DOG that were run for 1 μs . The cumulative length of the aforementioned MD runs amounted to 10.4 μs .

All data collections and equilibration runs were performed using GROMACS 4 (24), and the all-atom OPLS force field (25) was used for the protein in combination (26) with the Berger model for PC lipids (27) and with the TIP3P model (28) for water molecules. For DOG, we used our previous model based on the Berger model (with a charge of -0.7 e on the hydroxyl) (17). Because OPLS-AA and Berger lipids have different 1-4 combination rules, the half- ϵ double-pairlist method was used to mix both force fields (26,29). Electrostatic interactions were calculated with the Ewald particle mesh method (30), with a real-space cutoff of 1 nm. Bonds lengths were constrained using the LINCS algorithm (31) and the integration time step was set to 2 fs. The system was coupled to a Bussi thermostat (32) and to a semiisotropic Parrinello-Rahman barostat (33) at a temperature of 300 K and a pressure of 1 atm. Additional simulations of 1–2 μs of the ALPS motif of ArfGAP1 in a DOPC/DOG (85:15) bilayer were carried out at higher temperatures and are described in the [Supporting Material](#). In addition, MD simulations of a toluene molecule, analog to phenylalanine side chain (34), and of two model peptides representative of individual turns of ALPS motifs (amino acid sequence: SFLG and SLG) are described in the [Supporting Material](#).

Packing defects were computed using the Cartesian method described in the companion article (23). Unless otherwise specified, the packing defects discussed in this study are geometrical packing defects, i.e., packing defects that extend below the glycerol level. By convention, we define the instantaneous glycerol level as the average value along the normal to the membrane plane of the *sn*-2 carbon atom of all lipid molecules (for each leaflet separately) at a given time.

Data analysis was done using GROMACS utilities, and molecular images were made with the use of Visual Molecular Dynamics (VMD) (35) and PyMol (36).

CD spectroscopy

The ArfGAP1[197-231] peptide, whose N- and C-termini were acylated and aminated, respectively, was purchased from Proteogenix (France). DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) and DOG

(1-2-dioleoyl-*sn*-glycerol) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The peptide was solubilized in 10 mM Tris pH 7.2, 120 mM NaCl buffer, and the concentration of stock solutions was carefully determined by absorbency at 280 nm ($\epsilon = 6990 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). To produce liposomes, dried films were prepared by evaporation of lipids in chloroform and resuspended in 10 mM Tris pH 7.2 and 120 mM NaCl. After five freeze-thawing cycles, the liposome suspension (10 mM lipids) was extruded through $0.2 \mu\text{m}$ polycarbonate filters. Alternatively, the suspension was sonicated with a titanium tip sonicator to obtain small liposomes. Titanium and lipid debris were removed by centrifugation at $100,000 g$ for 20 min. The hydrodynamic radius (R_H) of large and small liposomes was determined by dynamic light scattering in a Dyna Pro instrument. Liposomes were stored at room temperature and used within 2 days after preparation. The CD experiments were performed on a Jasco J-815 spectrometer at controlled temperature with a quartz cell of 0.05 cm path length. Each spectrum is the average of 10 scans recorded from 200 to 260 nm with a bandwidth of 1 nm, a step size of 0.5 nm, and a scan speed of 50 nm/min. Control spectra of buffer with or without liposomes were subtracted from the peptide spectra.

RESULTS AND DISCUSSION

The ALPS motif of ArfGAP1 binds to DOPC/DOG bilayers via the insertion of large hydrophobic residues

According to several observations and models (37–41), amphipathic peptides bind to lipid bilayers in two steps: partitioning of the peptide from the solvent to the interfacial region of the bilayer, followed by folding into a partial or complete α -helix. Although the dynamic behavior of the ALPS motif of ArfGAP1 in its α -helical state when inserted into a lipid bilayer was recently reported (17), little is known about its partitioning mechanism at the molecular level. Previous experiments showed that ALPS binds to large liposomes containing conical lipids as efficiently as it does to small liposomes (1,2). We thus conducted CD experiments to check the secondary structure upon binding and to determine the optimal content of DOG for binding to large liposomes. These experiments indicated that a DOPC/DOG ratio of 85:15 is appropriate, because the ALPS peptide is capable of binding to large liposomes of such composition, but this capability is severely hampered when DOG is removed (Fig. 1).

To characterize the mechanism of ALPS motif partitioning into a model membrane, we thus performed MD simulations of the ALPS motif of ArfGAP1 in the presence of an explicit lipid bilayer. A total of five MD replicas (Table 1) for a cumulative length of $3.2 \mu\text{s}$ were performed starting from a conformation in which the peptide was unfolded and placed $>2 \text{ nm}$ away from the bilayer surface (see Materials and Methods). This choice was motivated by recent MD simulations that showed that amphipathic peptides in an initial random-coil structure form contacts with lipids more frequently than do folded peptides (42), and it was further justified by the a posteriori observation that the ALPS motif is able to sample multiple conformations before binding to the bilayer (Fig. S1). We also noted that

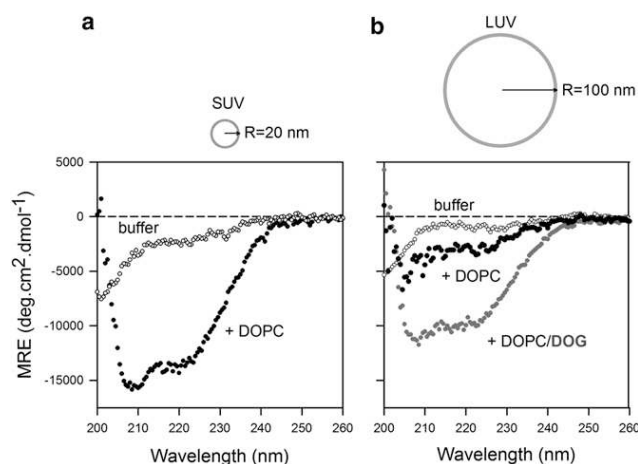


FIGURE 1 The ALPS motif of ArfGAP1 binds to large DOPC/DOG liposomes. (a) CD spectra of the ArfGAP1 (amino acids 197–231) peptide in the absence (white dots) or presence (black dots) of sonicated DOPC liposomes ($R_H = 16.6 \pm 8 \text{ nm}$). (b) Spectra of the peptide alone (white dots) or in the presence of large DOPC ($R_H = 115 \pm 52 \text{ nm}$; black dots) or DOPC/DOG liposomes (85/15 mol/mol, $R_H = 108 \pm 48 \text{ nm}$; gray dots). All experiments were performed at 25°C in 10 mM Tris pH 7.2 and 120 mM NaCl buffer. Peptide concentration: $25 \mu\text{M}$; lipid concentration: 5 mM .

the peptide could bind to the upper or lower leaflet (due to periodic conditions) independently of the initial configuration, which suggests that the results were not biased by the choice of the starting point.

The details of the binding mechanism are summarized in Table 1. In all replicas, the peptide started adsorbing to the lipid bilayer within the first 100 ns through the insertion of one hydrophobic residue below the glycerol group of the lipids. Of importance, and regardless of the residue that inserted, insertion was always irreversible, i.e., the residue never dissociated from the bilayer, but instead resided around the glycerol level for the remainder of the simulation (Fig. S2). In four out of five replicas, the residue that inserted first was phenylalanine 26 (F26), possibly as a consequence of its proximity to a lysine (K25), which may favor bilayer binding through electrostatic interactions with the lipid polar headgroups. In the fifth replica, the insertion proceeded through the simultaneous insertion, in very close spatial proximity, of leucine 12 (L12) and alanine 34 (A34) into the lipid bilayer. In two out of four replicas, insertion of F26 was followed by insertion of a distant residue, phenylalanine 4 (F4), which itself was accompanied by an almost simultaneous very shallow insertion of a nearby leucine (L5).

An example of the time evolution of peptide insertion is detailed in Fig. 2. The insertion of F26 took place after $\sim 50 \text{ ns}$ (Fig. 2 a) and was associated with a large decrease ($\sim 300 \text{ kJ/mol}$) in the Lennard-Jones (LJ) interaction between the peptide and the lipid bilayer (Fig. 2 c). The second event, insertion of F4, took place after 218 ns

TABLE 1 Insertion mechanism of the ALPS motif of ArfGAP1 in a DOPC/DOG (85:15) bilayer

MD run	MD length	Insertion sequence						Protein-bilayer LJ (kJ/mol) ^b
		Insertion 1			Insertion 2			
		Time (ns)	Amino acid	Defect size before insertion (nm ²) ^a	Time (ns)	Amino acid	Defect size before insertion (nm ²) ^a	
MD <i>a</i>	1 μ s	59	F26	0.29	-	-	-	-295
MD <i>b</i>	1 μ s	52	F26	0.75	437	F4	0.52	-591
MD <i>c</i>	400 ns	47	F26	0.23	218	F4	0.21	-552
MD <i>d</i>	400 ns	86	F26	0.21	-	-	-	-318
MD <i>e</i>	400 ns	103	L12	0.24	-	-	-	-442

^aThe defect size before insertion is the average value over the last nanosecond preceding insertion.

^bThe average protein-bilayer LJ energy is computed in the time window between 300 and 400 ns.

(Fig. 2 *b*) and was associated with a similar decrease in LJ interaction energy. In Fig. 2 *d*, the evolution of the backbone density of the peptide along the axis normal to the bilayer surface is plotted for consecutive time windows. Backbone insertion proceeded through two big jumps, at 40–80 and 200–240 ns time windows corresponding to F26 and F4 insertions, and was combined with smoother rearrangements of the backbone at the glycerol-phosphate interface. The conformation of the peptide in the bilayer after 280 ns is shown in Fig. 2 *e*.

Taken together, the various MD simulations indicate that the insertion of large hydrophobic residues is favored with respect to smaller ones (the ALPS motif of ArfGAP1 is also rich in alanines), suggesting that the DOPC/DOG

bilayer used in our simulations displays a permissive structure that allows large residues to insert.

Large hydrophobic residues of ALPS insert into preexisting packing defects

Next, we wished to determine how ALPS partitioning is coupled to the packing structure of the lipid bilayer. To that end, we used a Cartesian-based approach that is explained in detail in the companion article (23). In short, we selected a plane that was perpendicular to the membrane normal and created a grid of 0.1 nm resolution. For each grid point, we scanned the normal of the membrane plane starting from the solvent and descending up to 0.1 nm below the

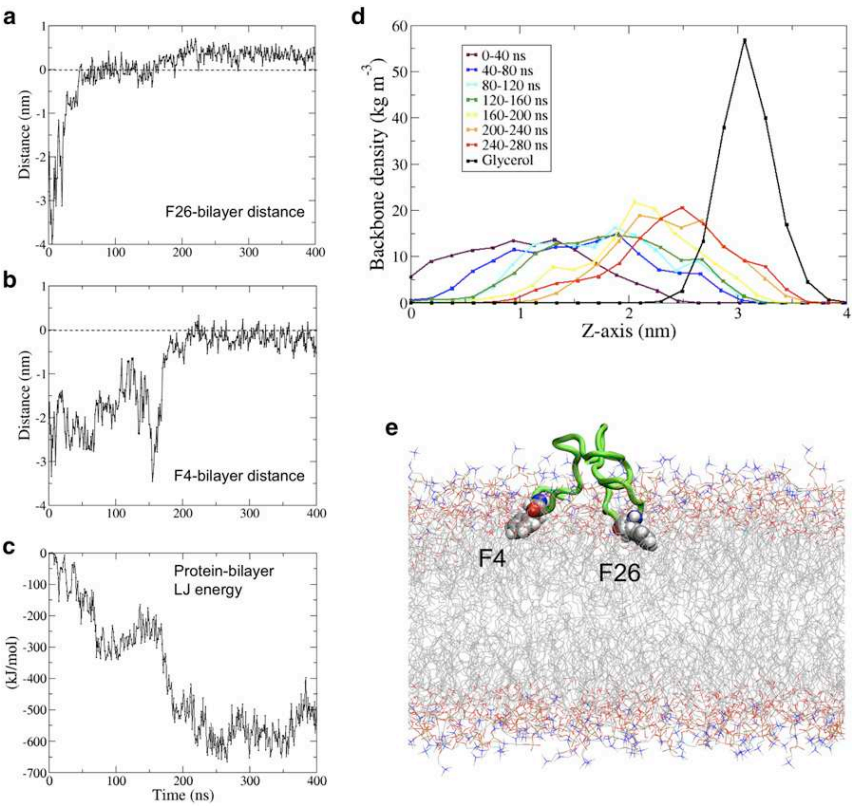


FIGURE 2 Insertion mechanism of the ALPS motif of ArfGAP1 in a DOPC/DOG bilayer. (*a*) Time evolution of the distance between the center of mass of residue F26 and the average glycerol level of lipid molecules. (*b*) Time evolution of the distance between the center of mass of residue F4 and the average glycerol level of lipid molecules. (*c*) Time evolution of the LJ energy between the protein and the lipid molecules. (*d*) Averaged time evolution of protein backbone density along the normal to the bilayer plane. (*e*) MD snapshot ($t = 280$ ns) of the ALPS motif of ArfGAP1 inserted into a DOPC/DOG bilayer. The peptide is shown in green in cartoon representation and the inserting phenylalanine residues (F26 and F4) are shown in van der Waals (vdW) representation. All data shown are taken from MD run *c*.

glycerol level. If no lipid atom was met, we retained the grid point and defined it as a geometrical defect of size of 0.01 nm^2 ; in all other cases the grid point was discarded. Adjacent elementary defects were then merged, resulting in defects of various sizes.

Fig. 3 shows a snapshot of the MD simulations, where the packing defects of a DOPC/DOG bilayer are represented (in blue) together with the ALPS motif. As expected, the regions where the peptide inserted colocalized with large packing defects. Interestingly, no correlation between the region of

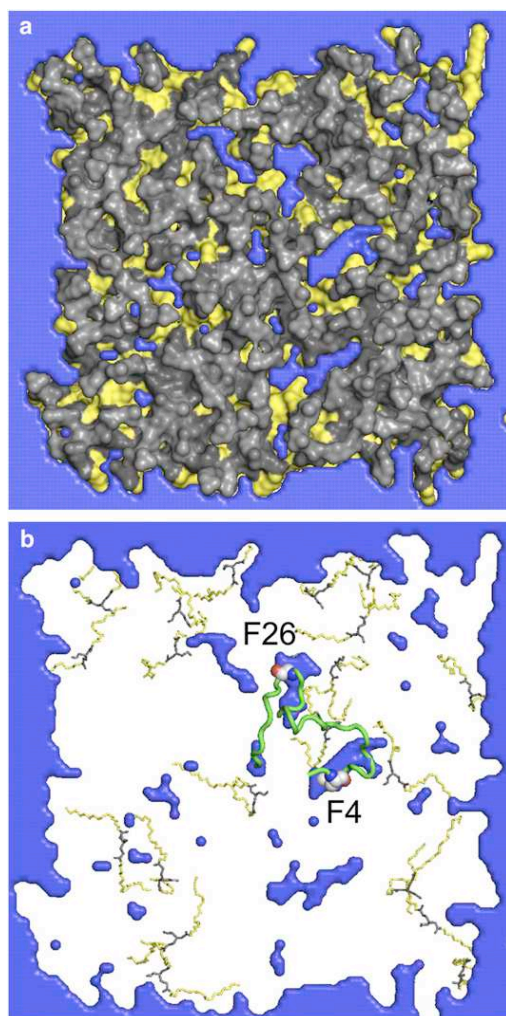


FIGURE 3 Colocalization between lipid packing defects and peptide insertion. (a) Top view of lipid molecules and packing defects in a representative snapshot from MD simulations of the ALPS motif of ArfGAP1 with a DOPC/DOG bilayer. Lipids are shown in surface representation with acyl chains in yellow and polar heads in gray. Packing defects are depicted in blue. The peptide is not shown. The apparent defects at the contour of the lipid bilayer are shown for clarity but are not considered as packing defects in the analysis. (b) Colocalization between the ALPS motif of ArfGAP1 and lipid packing defects. The peptide is shown in green in cartoon representation and the inserting phenylalanine residues (F26 and F4) are shown in vdW representation. DOG molecules are shown in licorice representation.

ALPS binding and the localization of DOG lipids was observed (the colocalization between packing defects and DOG lipids was constantly below 5% before and after peptide insertion), in agreement with the finding that DOG lipids do not generate packing defects in their close surroundings, but rather change macroscopic bilayer properties (23).

The overlap between peptide insertion and large packing defects could be interpreted in two ways. In the first scenario, the lipids reorient themselves after peptide insertion to accommodate the bulky Phe side chain. Alternatively, the peptide binds directly to one of the preformed transient cavities. To distinguish between these two possibilities, we studied the time correlation between phenylalanine insertion and the appearance of lipid packing defects.

Fig. 4 reports the dynamics of F26 insertion in a representative MD simulation. The red line represents the distance

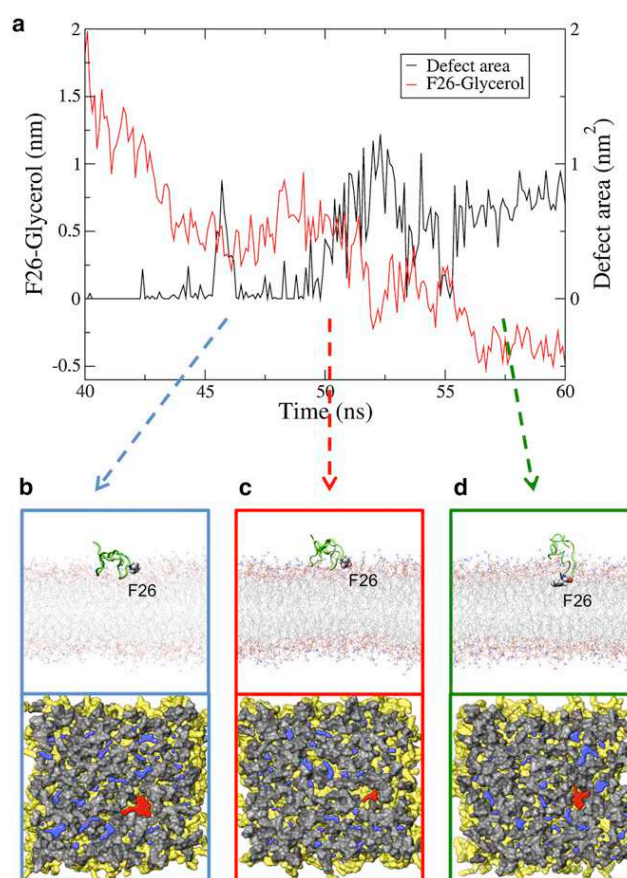


FIGURE 4 Role of packing defects in the insertion mechanism of hydrophobic residues. (a) Time evolution of the distance computed along the normal to the lipid bilayer between the center of mass of F26 and the average coordinate of the glycerol atoms (red) and time evolution of the size of the packing defect with the same coordinates in the membrane plane as F26 (black). (b–d) Upper panel: side view of the protein and lipid molecules in the proximity of a lipid packing defect at different times. In b, insertion does not take place; in c the residue is about to insert below the glycerol level; and in d the residue is fully inserted. Lower panel: localization of packing defects in the corresponding snapshots. The packing defect that is localized in close proximity to F26 is depicted in red.

between the center of mass of the inserting residue and the average coordinate of the glycerol, and the black line corresponds to the size of the geometrical packing defect that has the same coordinates in the membrane plane as the inserting residue (Fig. 4 *a*). F26 approached the lipid bilayer surface from the bulk solvent quite rapidly, taking ~ 4 ns to move from 2 nm to 0.5 nm above the glycerol level. At $t = 46$ ns, a large geometrical packing defect (maximum size of 0.9 nm^2) formed underneath F26 (Fig. 4 *b*). Although F26 was in close proximity to this defect, it did not insert, and the defect disappeared after 2 ns. Five nanoseconds later, another large defect formed (Fig. 4 *c*). This time, F26 was capable of inserting and resided there for the remainder of the simulation (Fig. 4 *d*).

We performed the same analysis for all simulations, defining insertion as the first snapshot for which the center of mass of the residue was below the average glycerol level and resided there for at least 1 ns. Strikingly, in all cases a geometrical packing defect extending for at least 0.1 nm below the glycerol was already present before insertion (Table 1). After insertion, the size of the defect remained approximately unchanged for the remainder of the simulation, and no dissociation of the inserting residues was observed. The desolvation cost of the polar heads associated with the hydrophobic insertion may explain why the residue does not insert each time a defect is formed (it also justifies our choice to wait 1 ns for defining an insertion event). Interestingly, the size of these geometrical defects was always $>0.2 \text{ nm}^2$ (Table 1), a dimension that is compatible with the size of the aromatic side chain of phenylalanine.

To further improve the statistics of the colocalization between hydrophobic insertions and preexisting lipid packing defects, we performed additional MD simulations of toluene molecules, analog to phenylalanine side chain (34), and of model peptides representative of conserved individual turns of ALPS motifs (amino acid sequence: SFLG and SLG). Whereas the insertion of toluene into DOPC/DOG bilayers (lacking any polar moiety) did not correlate with preexisting packing defects (Fig. S3), the insertions of the two minimal ALPS peptides correlated perfectly with preexisting packing defects (Fig. S4). Thus, hydrophobic side chains in an otherwise flexible and polar sequence can act as probes to detect packing defects in lipid bilayers.

Peptide insertion induces only minor modifications of the statistical distribution of free packing defects

Next, we assessed the effect of peptide insertion on the packing defect structure of the bilayer. For this, we computed the size distribution of packing defects of the DOPC/DOG bilayer after F26 insertion and compared it with the same distribution for a pure DOPC/DOG bilayer (Fig. 5). We initially performed this analysis on the entire

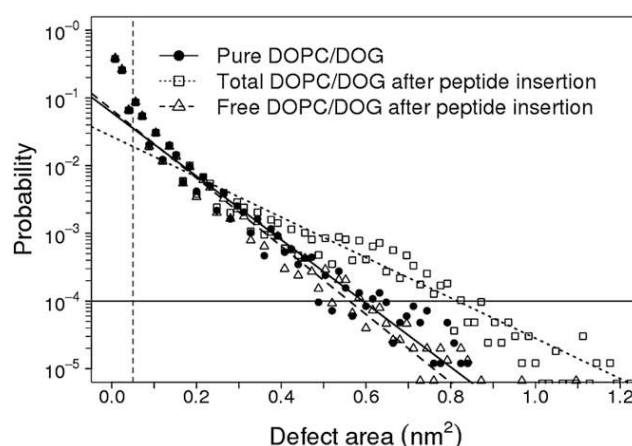


FIGURE 5 Effect of peptide insertion on the size distribution of lipid packing defects. Histograms and exponential fit of defect areas in different conditions: pure DOPC/DOG bilayer (black dots) and DOPC/DOG bilayer after peptide insertion (white squares and white triangles). White squares: all packing defects in the leaflet where insertion takes place; white triangles: packing defects in the leaflet where insertion takes place after removal of defects that are occupied by the inserting peptide.

bilayer surface by counting all defects, whether they were covered or not by the ALPS peptide.

Binding of the peptide to the bilayer significantly increased the occurrence of large packing defects compared with small ones. The difference with respect to a pure DOPC/DOG bilayer was significant for defects $>0.3 \text{ nm}^2$. This size is comparable to the value observed for the preexisting defects into which hydrophobic residues inserted (Table 1).

Next we refined the surface analysis by distinguishing, in the leaflet where insertion takes place, the defects underneath the ALPS motif from those remaining in the naked part of the bilayer. From this analysis, we made two important observations. First, the very large defects were directly underneath the ALPS motif, suggesting that hydrophobic residues, once inserted, stabilize large packing defects by filling them. This stabilization is a corollary of the fact that hydrophobic insertions are irreversible within our time-scale. Second, and importantly, the surface that was not in contact with ALPS displayed a packing defect probability distribution very close to that observed before insertion. Therefore, should a second insertion occur, it would be facing a similar membrane structure as the first one. This picture is suggestive of an iterative process whereby the packing structure of the bilayer can be probed n times thanks to the repetitive feature of the ALPS sequence.

Binding of ALPS motifs to the lipid bilayer is an iterative process

Within the timescale of our simulations ($\approx 1 \mu\text{s}$) at room temperature, partitioning of the ALPS motif of ArfGAP1 into the bilayer was not complete, because only one or two hydrophobic insertions could be observed.

To circumvent this and to speed up the partitioning process, we first performed MD simulations at higher temperatures (see [Supporting Material](#) for details). As expected, we observed more insertions compared with MD performed at room temperature. Depending on the simulation, the sequence order of the insertions varied, suggesting a random process ([Table S1](#)). Interestingly, the partitioning process seemed to involve different steps: 1), adsorption of many hydrophobic residues while the peptide was still in a molten globule state; 2), peptide extension along the membrane surface; and 3), transient formation of helical segments on the N- and C-termini of the peptide.

The results of a simulation performed at nonphysiological temperature must be interpreted with caution. Using CD spectroscopy, we noticed a gradual decrease in the α -helicity of the ALPS peptide when it was incubated with DOPC/DOG (85:15) liposomes at increasing temperature ([Fig. S5](#)). In addition, a geometrical analysis of the lipid packing structure shows that increasing temperature induces a general increase in the size and number of lipid packing defects ([Fig. S6](#)), although both the exponential distribution and the relative difference between different lipid compositions remain valid. Notwithstanding these limitations, simulations at high temperature are suggestive of an iterative process whereby the ALPS motif of ArfGAP1 senses n times the packing structure of the bilayer through multiple hydrophobic insertions.

As an independent test of the iterative insertion model, we next performed room-temperature MD simulations of another ALPS motif that displays high sensitivity to membrane curvature, that of GMAP210, a tethering factor that

regulates vesicular transport in the Golgi apparatus (9). The choice of this motif was motivated by two main observations: 1) it has a large number of bulky hydrophobic residues that can potentially insert into bilayer defects; and 2), it contains a high number of glycines that should confer higher flexibility to the motif.

Five independent MD simulations of the ALPS motif of GMAP210 in the presence of DOPC/DOG bilayer confirmed that the peptide binds to the bilayer through repeated irreversible hydrophobic insertions into preformed packing defects in a stochastic manner ([Table 2](#)). Specifically, in two 1 μ s-long MD runs, we observed 10 and seven successive insertions ([Table 2](#) and [Fig. 6](#)), respectively, of large hydrophobic residues (Phe, Trp, Leu, Ile, and Met), and insertion of nearby residues was accompanied by the formation of transient α -helical turns.

ALPS motifs prefer lipid bilayers with a higher density of large packing defects

Because ALPS motifs seem to partition into membranes through successive insertions of hydrophobic residues in distinct packing defects, the availability of large packing defects in a limited portion of the bilayer should determine the speed of insertion.

To test this hypothesis, we simulated the ALPS motifs of ArfGAP1 and GMAP210 in the presence of a DMPC bilayer, a lipid composition that, given the full saturation of the acyl chains, is very scarce in packing defects ([Fig. 7 a](#)) (23). To compare the results with the simulations performed in the presence of the DOPC/DOG bilayer, we adopted an identical

TABLE 2 Insertion mechanism of the ALPS motif of ArfGAP1 and GMAP210 in different lipid bilayers

Peptide	Lipid bilayer	MD run	MD length	Sequence of insertions (time) ^a	Insertions before 400 ns
ArfGAP1	DOPC DOG	1	1 μ s	F26 (59 ns)	7
		2	1 μ s	F26 (52 ns); F4(437 ns); L5 (440 ns); M9 (532 ns)	
		3	400 ns	F26 (47 ns), F4 (218 ns); L5 (220 ns)	
		4	400 ns	F26 (86 ns)	
		5	400 ns	L12 (103 ns)	
ArfGAP1	DMPC	1	400 ns	F19 (196 ns); W16 (360 ns)	4
		2	400 ns	-	
		3	400 ns	-	
		4	400 ns	F26 (133 ns)	
		5	400 ns	F26 (218 ns)	
GMAP210	DOPC DOG	1	1 μ s	F33 (18 ns); M1 (28 ns); L5 (112 ns); I30 (155 ns); L26 (224 ns); W4 (310 ns); M37 (430 ns); L16 (431 ns); L38 (459 ns); L8 (533 ns)	19
		2	1 μ s	M1 (24 ns); W5 (122 ns); L5 (294 ns); L23 (736 ns); L12 (810 ns); L16 (833 ns); L8 (848 ns)	
		3	400 ns	L23 (19 ns); L26 (19 ns); I30 (20 ns)	
		4	400 ns	L8 (52 ns); L23 (165 ns); L26 (245 ns)	
		5	400 ns	W4 (49 ns); M1 (178 ns); L16 (329 ns); L26 (399 ns)	
GMAP210	DMPC	1	400 ns	-	8
		2	400 ns	L12 (53 ns); L8 (191 ns); L5 (194 ns)	
		3	400 ns	I30 (331 ns)	
		4	400 ns	L26 (64 ns)	
		5	400 ns	W4 (50 ns); L5 (50 ns); F33 (106 ns)	

^aOnly the insertions of large hydrophobic residues (Phe, Trp, Met, Leu, and Ile) are considered.

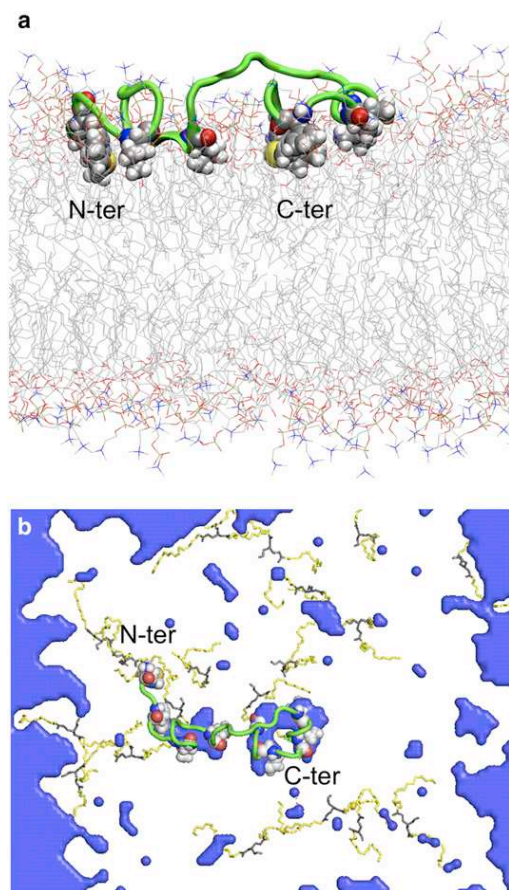


FIGURE 6 The ALPS motif of GMAP210 exhibits repeated hydrophobic insertions in DOPC/DOG bilayers. (a) Side view of an MD snapshot (after 1 μ s) of the ALPS motif of GMAP210 inserted into a DOPC/DOG lipid bilayer. The peptide is shown in green in cartoon representation and the inserting hydrophobic residues (M1, W4, L5, L8, L16, L26, I30, F33, M37, and L38) are shown in vdW representation. (b) Top view of the colocalization between the hydrophobic insertions and geometrical lipid packing defects (blue). DOG molecules are shown in licorice representation. C- and N-terminal regions are explicitly indicated. A small defect below the N-terminus is not visible due to overlap with the N-terminus of the peptide.

protocol (see Materials and Methods). The data presented in Fig. 7 *b* were collected from five MD replicas of 400 ns each in the following systems: ArfGAP1+DOPC/DOG, ArfGAP1+DMPC, GMAP210+DOPC/DOG, and GMAP210+DMPC (see Table 2 for additional details).

The data shown in Fig. 7 *b* support the notion that the statistical distribution of packing defects is a critical feature of ALPS binding to model membranes. In particular, although the molecular mechanism of partitioning is the same, the total number of hydrophobic insertions of ALPS motifs decreased substantially from DOPC/DOG to DMPC. A similar behavior was observed for both the toluene molecules and the model peptide SLG (see Supporting Material).

The average depth of insertion also appeared to be more pronounced in the DOPC/DOG bilayer, but the limited

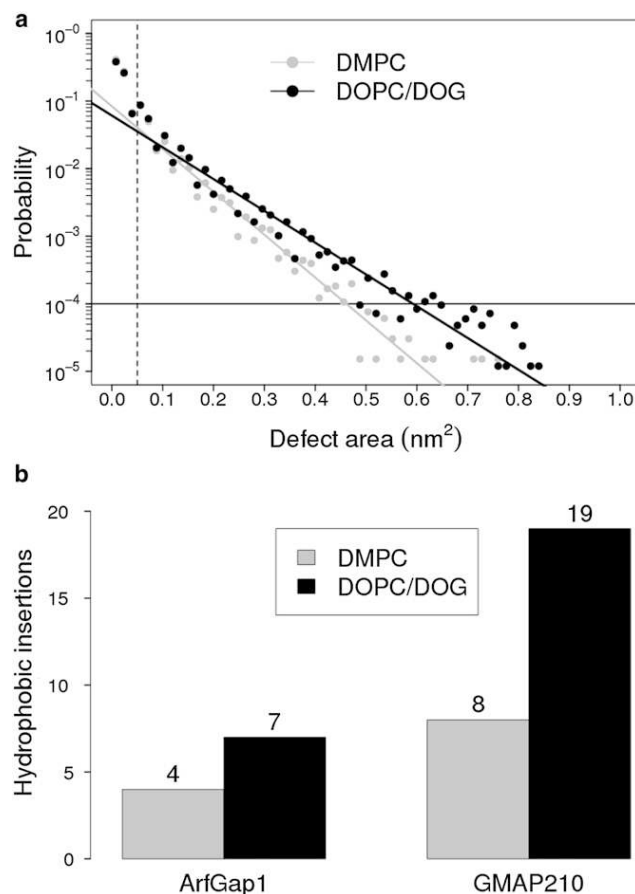


FIGURE 7 Effect of packing defects on ALPS partitioning in the lipid bilayer. (a) Size distribution of packing defects for mixed DOPC/DOG (black) and pure DMPC (gray) bilayers. The ratio between the total area of lipid packing defects > 0.2 nm² and the total surface area is 0.47% for DOPC/DOG and 0.19% for DMPC. (b) Total number of hydrophobic insertions in five independent MD simulations of 400 ns each for the ALPS motifs of ArfGAP1 and GMAP210 with DOPC/DOG (black) and DMPC (gray) bilayers. (Note that panel *a* is a simplified version of Fig. 5 in the companion article (23).

number of insertions observed in the case of DMPC did not allow us to obtain a reliable estimate for this property. In addition, whereas in the case of DOPC/DOG the peptides always bound to the lipid bilayer, this was not the case for DMPC. Indeed, three out of the 10 simulations of ALPS motifs in the presence of a DMPC bilayer did not show any insertion event in the first 400 ns (Table 2).

Finally, it must be noted that the ratio between hydrophobic insertions in DOPC/DOG versus DMPC bilayers is more pronounced in the MD simulations of GMAP210 than in those of ArfGAP1. This is not unexpected if the probability of hydrophobic insertion is proportional to the likelihood of detecting a packing defect of a given size. Because it partitions into the bilayer more rapidly than the ALPS motif of ArfGAP1, the GMAP210 ALPS motif is more suited to detect differences between the two bilayers within the timescales of our computational technique.

CONCLUSIONS

Because of their sensitivity to membrane curvature and to the insertion of conical lipids in flat bilayers, ALPS motifs have been defined as lipid-packing sensors (10). However, the concept of lipid packing defects is inherently microscopic, and its explicit characterization with biophysical experiments has not been possible so far.

Atomistic MD simulations indicate that packing defects are indeed a measurable geometrical property of membranes, and that bilayers of different curvature (22) and/or composition (23) display different packing defect structures that one can identify by plotting their occurrence against their size. Importantly, the main differences between bilayers occur for packing defects of large size.

In a previous study, we examined the behavior of the ALPS motif of ArfGAP1 when it was folded in its α -helical conformation and embedded inside a DOPC/DOG membrane (17). In this work, we performed MD simulations of ALPS motifs in the presence of lipid bilayers to examine the early steps of binding and to understand the relationship between packing defects and the mechanism of membrane curvature sensing by ALPS motifs. With this technique, we are limited to timescales of the order of the microsecond and cannot follow the complete partitioning and folding of the peptide at physiological temperature. Nevertheless, we could repeatedly observe spontaneous hydrophobic insertions in the bilayer with very high resolution and collect enough sampling to correlate peptide binding with the behavior of packing defects in model membranes.

Our results indicate that packing defects are equivalent to nonspecific dynamical binding pockets for membrane sensor peptides, and that ALPS motifs bind to large preexisting packing defects. The overall process of adsorption proceeds through separate insertions of bulky hydrophobic residues below the glycerol level. Remarkably, the fact that we were able to tune the occurrence probability of large packing defects either by introducing conical lipids or by altering the number of monounsaturated acyl chains composing our bilayer implies that a well-localized interfacial event, such as binding of a peripheral protein, can be controlled by bulk properties of the bilayer in a nontrivial way.

Besides ALPS motifs, other protein modules use hydrophobic residues or modifications to bind to lipid membranes. Therefore, and as previously proposed (7,19), sensing of membrane curvature through the detection of packing defects may be a quite general mechanism. However, in other molecular contexts (e.g., BAR domains and α -synuclein), hydrophobic insertions of various sizes combine with other mechanisms, such as electrostatics or scaffolding (20,43–46), thereby obscuring the role of lipid packing defects in the overall process of membrane binding.

What is remarkable in the case of ALPS motifs is the exclusive use of hydrophobic insertions all along their sequence. This specificity amplifies the role of packing

defects in the mechanism of peptide binding and can be appreciated by comparing an elementary insertion event in a DMPC bilayer and a DOPC/DOG bilayer, two extreme cases in terms of lipid packing defect distributions. In both cases, a packing defect large enough to accommodate the insertion of a first hydrophobic residue can be found. However, the scarcity of large lipid packing defects in the DMPC membrane makes this event less likely. Thereafter, the ALPS motif, which is quite flexible owing to its glycine residues, may detect packing defects that are spatially distant from the first one. Therefore, the second insertion should be governed by the same probability function as the first one, and should be less favorable in a DMPC membrane than in a DOPC/DOG membrane. On the scale of a complete ALPS motif containing five to 10 putative hydrophobic insertions, this iterative process, which is analogous to probing n times the packing structure of the bilayer (4), should result in a dramatic increase in sensitivity. Even if other energetic terms (e.g., the contributions arising from peptide folding and lipid rearrangements) are likely to contribute to the overall thermodynamic behavior of the system, the mechanism highlighted by the MD simulations helps us understand how ALPS motifs are able to trigger biochemical pathways by responding so effectively to small differences in lipid packing that arise from modest changes in the molecular architecture of the cell (e.g., when the radius of a Golgi vesicle changes from 60 to 30 nm).

SUPPORTING MATERIAL

Six supplemental figures, one table, and reference (47) are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(12\)05143-0](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(12)05143-0).

The authors thank Luca Monticelli for providing the initial topology of DOPC lipids, Drew Bennett and Peter Tieleman for the force field of toluene, all members of the Antonny laboratory for support and comments, and Alenka Copic for comments on the manuscript.

This work used the high-performance computing resources of CINES under allocations c2011-076720, c2012-076720, and c2012-076859 from Grand Equipement National de Calcul Intensif. Some computations were done on the Mesocentre SIGAMM machine hosted by the Observatoire de la Cote d'Azur. This work was supported by the Swiss National Science Foundation (grant PBELP3_141118 to S.V.), the French Government (grant MENRT to L.V.), and the European Research Council (advanced grant 268888 to B.A.).

REFERENCES

1. Antonny, B., I. Huber, ..., D. Cassel. 1997. Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J. Biol. Chem.* 272:30848–30851.
2. Bigay, J., P. Gounon, ..., B. Antonny. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature*. 426:563–566.
3. McMahon, H. T., and J. L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 438: 590–596.

4. Antonny, B. 2011. Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annu. Rev. Biochem.* 80:101–123.
5. Zimmerberg, J., and M. M. Kozlov. 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:9–19.
6. Roux, A., G. Koster, ..., P. Bassereau. 2010. Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 4141–4146.
7. Bhatia, V. K., N. S. Hatzakis, and D. Stamou. 2010. A unifying mechanism accounts for sensing of membrane curvature by BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:381–390.
8. Rudner, D. Z., and R. Losick. 2010. Protein subcellular localization in bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a000307.
9. Drin, G., V. Morello, ..., B. Antonny. 2008. Asymmetric tethering of flat and curved lipid membranes by a golgin. *Science.* 320:670–673.
10. Bigay, J., J. F. Casella, ..., B. Antonny. 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J.* 24:2244–2253.
11. Drin, G., J. F. Casella, ..., B. Antonny. 2007. A general amphipathic α -helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:138–146.
12. Doucet, C. M., J. A. Talamas, and M. W. Hetzer. 2010. Cell cycle-dependent differences in nuclear pore complex assembly in metazoa. *Cell.* 141:1030–1041.
13. Cabrera, M., L. Langemeyer, ..., C. Ungermann. 2010. Phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif switches function of the HOPS subunit Vps41 in membrane tethering. *J. Cell Biol.* 191:845–859.
14. Krabben, L., A. Fassio, ..., V. Haucke. 2011. Synapsin I senses membrane curvature by an amphipathic lipid packing sensor motif. *J. Neurosci.* 31:18149–18154.
15. Fan, W., A. Nassiri, and Q. Zhong. 2011. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:7769–7774.
16. Mesmin, B., G. Drin, ..., B. Antonny. 2007. Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry.* 46:1779–1790.
17. González-Rubio, P., R. Gautier, ..., P. F. Fuchs. 2011. Amphipathic-Lipid-Packing-Sensor interactions with lipids assessed by atomistic molecular dynamics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808:2119–2127.
18. Baumgart, T., B. R. Capraro, ..., S. L. Das. 2011. Thermodynamics and mechanics of membrane curvature generation and sensing by proteins and lipids. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 62:483–506.
19. Hatzakis, N. S., V. K. Bhatia, ..., D. Stamou. 2009. How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nat. Chem. Biol.* 5:835–841.
20. Bartels, T., L. S. Ahlstrom, ..., K. Beyer. 2010. The N-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys. J.* 99:2116–2124.
21. Lee, A. G. 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666:62–87.
22. Cui, H., E. Lyman, and G. A. Voth. 2011. Mechanism of membrane curvature sensing by amphipathic helix containing proteins. *Biophys. J.* 100:1271–1279.
23. Vamparys, L., R. Gautier, ..., P. F. F. Fuchs. 2013. Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys. J.* 104:585–593.
24. Hess, B., C. Kutzner, ..., E. Lindahl. 2008. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular dynamics simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4:435–447.
25. Jorgensen, W. L., D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives. 1996. Development and testing of the OPLS All-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 118:11225–11236.
26. Tieleman, D. P., J. L. Maccallum, ..., L. Monticelli. 2006. Membrane protein simulations with a united-atom lipid and all-atom protein model: lipid-protein interactions, side chain transfer free energies and model proteins. *J. Phys. Condens. Matter.* 18:S1221–S1234.
27. Berger, O., O. Edholm, and F. Jähnig. 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 72:2002–2013.
28. Jorgensen, W. L., W. L. Jorgensen, ..., M. L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79:926–935.
29. Chakrabarti, N., C. Neale, ..., R. Pomès. 2010. An iris-like mechanism of pore dilation in the CorA magnesium transport system. *Biophys. J.* 98:784–792.
30. Essmann, U., L. Perera, ..., L. G. Pedersen. 1995. A smooth particle mesh ewald method. *J. Chem. Phys.* 103:8577–8593.
31. Hess, B., H. Bekker, ..., J. G. E. M. Fraaije. 1997. LINC: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* 18: 1463–1472.
32. Bussi, G., D. Donadio, and M. Parrinello. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126:014101.
33. Parrinello, M., and A. Rahman. 1981. Polymorphic transitions in single-crystals—a new molecular-dynamics method. *J. Appl. Phys.* 52:7182–7190.
34. MacCallum, J. L., W. F. Bennett, and D. P. Tieleman. 2008. Distribution of amino acids in a lipid bilayer from computer simulations. *Biophys. J.* 94:3393–3404.
35. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14:33–38, 27–28.
36. DeLano, W. L. The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA. <http://www.pymol.org>.
37. Ladokhin, A. S., and S. H. White. 1999. Folding of amphipathic α -helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J. Mol. Biol.* 285:1363–1369.
38. White, S. H., and W. C. Wimley. 1998. Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376: 339–352.
39. Ulmschneider, M. B., J. P. Doux, ..., J. P. Ulmschneider. 2010. Mechanism and kinetics of peptide partitioning into membranes from all-atom simulations of thermostable peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 132:3452–3460.
40. Tang, J., R. S. Signarvic, ..., F. Gai. 2007. Role of helix nucleation in the kinetics of binding of mastoparan X to phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 46:13856–13863.
41. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415:389–395.
42. Wang, Y., D. E. Schlamadinger, ..., J. A. McCammon. 2012. Comparative molecular dynamics simulations of the antimicrobial peptide CM15 in model lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1818:1402–1409.
43. Pranke, I. M., V. Morello, ..., C. L. Jackson. 2011. α -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. *J. Cell Biol.* 194:89–103.
44. Cui, H., G. S. Ayton, and G. A. Voth. 2009. Membrane binding by the endophilin N-BAR domain. *Biophys. J.* 97:2746–2753.
45. Arkhipov, A., Y. Yin, and K. Schulten. 2009. Membrane-bending mechanism of amphiphysin N-BAR domains. *Biophys. J.* 97:2727–2735.
46. Taylor, A., and M. S. Sansom. 2010. Studies on viral fusion peptides: the distribution of lipophilic and electrostatic potential over the peptide determines the angle of insertion into a membrane. *Eur. Biophys. J.* 39:1537–1545.
47. Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, ..., J. R. Haak. 1984. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81:3684–3690.

RÉSUMÉ

Certains processus biologiques tels que le transport vésiculaire sont régulés par des motifs qui guident les protéines vers les membranes courbées. L'un d'entre eux est le motif ALPS (*Amphipathic Lipid Packing Sensor*) qui reconnaît les défauts de *packing* provoqués par la courbure convexe de la membrane. Dans ce travail, nous combinons des simulations de dynamique moléculaire (DM) et des expériences de dichroïsme circulaire (CD) pour comprendre ce phénomène à l'échelle moléculaire. Les simulations de DM nous ont permis de caractériser et de quantifier les défauts de *packing* entre les lipides. Nous montrons que les défauts de *packing* provoqués par la courbure membranaire sont similaires à ceux provoqués par l'introduction de lipides coniques dans une bicouche plate composée de lipides cylindriques. En examinant l'interaction du motif ALPS avec une membrane contenant de tels défauts, nous montrons que l'insertion précoce de ce motif à la membrane est guidée par l'insertion de ses gros résidus hydrophobes dans des défauts pré-existants. Les expériences de CD et les simulations de DM avec échanges de répliques indiquent que les défauts facilitent le repliement du motif ALPS en une hélice alpha partielle. Enfin, les expériences de CD nous ont permis d'explorer la thermodynamique d'insertion du motif ALPS en fonction de la composition lipidique. Notre travail suggère que la composition de séquence particulière du motif ALPS ainsi que son faible taux d'hélicité jouent un rôle dans la reconnaissance des défauts de *packing*, donc de la courbure.

ABSTRACT

Some biological processes such as vesicular transport are regulated by motifs that guide proteins to curved membranes. One of them is the ALPS (*Amphipathic Lipid Packing Sensor*) motif that recognizes packing defects induced by the convex curvature of the membrane. In this work, we combine molecular dynamics (MD) simulations and circular dichroism (CD) experiments to understand this phenomenon at the molecular level. MD simulations allowed us to characterize and quantify lipid packing defects. We show that packing defects caused by the membrane curvature are similar to those caused by the introduction of conical lipids in a flat bilayer composed of cylindrical lipids. By examining the interaction of the ALPS motif with a membrane containing such defects, we show that the early insertion of this motif on the membrane surface is driven by the insertion of its bulky hydrophobic residues in pre-existing defects. CD experiments and replica exchange MD simulations indicate that defects facilitate the ALPS folding into a partial alpha-helix. Finally, CD experiments allowed us to explore the thermodynamics of ALPS motif insertion as a function of lipid composition. Our work suggests that the peculiar amino-acid composition of the ALPS motif, as well as, its low helicity play a role in the recognition of packing defects, therefore curvature.